



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Faculté de Pharmacie
U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
Ecole doctorale BioSE
Département de formation doctorale :

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

En Sciences du Vivant

Par **Marion GRARE**

De la genèse d'une nouvelle classe d'antibactériens à base de
polyphénols cycliques de type calixarène.

Etudes moléculaire(s), cellulaire(s), et structurale(s) en
vue de l'identification des cibles d'action : le cas du para-
guanidinoéthylcalix[4]arène.

Soutenance publique prévue le 3 juin 2009

Membres du Jury

Rapporteurs :

M. Jean FRENEY	Professeur, Université Claude Bernard, Lyon
M. Jean-Yves MAILLARD	Senior Lecturer, Cardiff University, Grande Bretagne

Examineurs :

M. Patrick PLESIAT	Professeur, Université de Franche Comté, Besançon
M. Etienne DAGUE	Chargé de Recherche, CNRS, LAAS, Toulouse
M. Jean-Claude BLOCK	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy 1
Mme Chantal FINANCE	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy 1 (directrice de thèse)
M. Raphaël E. DUVAL	MCU, Université Henri Poincaré, Nancy 1 (co-encadrant)

« Notre plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber,
Mais de nous relever après chaque chute. »

Confucius (philosophe chinois ; 555-479 avt JC)

« Il faut collectionner les pierres qu'on vous jette. C'est le début d'un piédestal. »

Hector Berlioz (compositeur français ; 1803-1869)

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

Je tiens à vous témoigner ma gratitude et mes plus sincères remerciements, vous me faites un immense honneur en acceptant de participer à l'évaluation de cette thèse.

A M. les Pr. Jean FRENEY, et Dr. Jean-Yves MAILLARD, rapporteurs,

Vous me faites un immense honneur en acceptant d'être rapporteurs de ce travail, et de siéger parmi le jury de cette thèse. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude pour votre disponibilité, vos précieux conseils et votre présence aujourd'hui.

Au Pr. Patrick PLESIAT, examinateur,

Recevez l'expression de ma profonde reconnaissance, pour avoir accepté de juger ce travail.

Au Dr. Etienne DAGUE, examinateur,

Que de souvenirs mémorables, et d'heures passées à regarder la pointe d'AFM en retenant notre souffle... ! Trouve-ici l'expression de mon admiration pour ton parcours exceptionnel et de mon amitié sincère.

Au Pr. Jean-Claude BLOCK, examinateur,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'évaluer ce travail, soyez-en chaleureusement remercié. Je vous remercie aussi de m'avoir permis de collaborer avec votre équipe (UMR 7564), et de découvrir l'AFM et la microélectrophorèse.

Au Pr. Chantal FINANCE, Directrice de thèse,

Je souhaite vous remercier pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, mais surtout pour votre disponibilité, vos qualités scientifiques et pédagogiques.

Au Dr. Raphaël E. DUVAL, Co-encadrant,

Tu as guidé chacun de mes pas, tout en respectant mon besoin d'indépendance et d'autonomie. Tu as su tempérer mes instants de fougue, et me pousser en avant dans mes (nombreux) moments de doutes. De cette aventure est née ce travail, et plus qu'une collaboration, une profonde amitié. Merci du plus profond du cœur, pour ta présence rassurante et enrichissante à mes côtés, et tes qualités scientifiques et humaines exceptionnelles. Que notre route soit encore longue !

*A toutes les personnes avec lesquelles j'ai collaboré pendant ces 3 années de thèse,
et sans qui ce travail n'aurait peut-être jamais vu le jour,*

Au Pr. Jean-Bernard REGNOUF-de-VAINS, Chef de l'équipe GEVSM,

Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir confié cette molécule prometteuse qu'est le Cx1.

A toutes les personnes que j'ai croisé au LCPME et au LEM, plus particulièrement à Yves WALDVOGEL, merci pour votre disponibilité, votre aide technique et votre bonne humeur.

Au Dr. Marie-Christine CONROY, et à toutes les techniciennes du laboratoire de Bactériologie, CHU Nancy, merci de m'avoir toujours ouvert la porte, et de réaliser les différentes évaluations (identifications, antibiogrammes) nécessaires à ce travail.

Au Pr. Jean-Luc OLIVIER, au Dr. Sophie ORLOWSKI-FREMONT, et à tous les techniciens du laboratoire de Biochimie, Hôpital Central, CHU Nancy,

Merci de m'avoir laissé l'accès au cytomètre en flux, merci pour votre accueil chaleureux, votre bonne humeur, et vos conseils techniques.

Au Dr. Serge BATTU, MCU, Faculté de Pharmacie, Limoges,

Tu m'as fait découvrir cette souris qui court dans une roue et qui porte le nom barbare de Fraction-Flux-Force. Trouve-ici l'expression de mes sincères remerciements pour la confiance que tu m'as accordée, pour ta disponibilité et ta gentillesse. En espérant que le travail initié, voit un jour le jour !

A toutes les stagiaires sans qui cette thèse n'aurait pas été si aboutie : Aurélie, Sarah, Tiphanie, Anne-Sophie, Coralie. Vos sourires, votre bonne humeur, nos éclats de rire mais aussi votre application dans votre travail et votre enthousiasme ont été les rayons de soleil de cette thèse. Merci pour tout.

A mes amis chimistes sans lesquels je n'aurais pu mener à bien ce projet, Maxime et Hugues, merci d'avoir prouvé chaque jour, qu'un pont entre chimie et biologie était envisageable !

A Stéphane,

Sans ta profonde amitié et ton soutien permanent, je ne serais pas là aujourd'hui. Merci mon petit Stéphou, pour nos discussions riches, même si parfois elles étaient houleuses, merci pour avoir bien voulu partager ton expérience avec moi. A tes côtés, j'ai énormément progressé, en tant que chercheuse, mais aussi et surtout en tant que personne. Merci d'être là, et merci d'être toi.

À tous ceux qui ont jalonné, jalonnent et jalonneront mon chemin...

Au Dr. Dominique L. MONNET, ECDC, Stockholm, Suède,

Tout est né d'une rencontre, à Budapest, en octobre 2006. Je commençais alors mon travail de thèse, et j'étais assaillie par de nombreux doutes. Votre enthousiasme concernant mon domaine de recherche et vos encouragements, m'ont aidé à continuer dans cette voie. Recevez l'expression de ma plus profonde gratitude pour votre soutien, votre disponibilité, votre gentillesse. Vos mails réguliers m'ont permis de continuer à croire en moi et en mon sujet de recherche.

Au Dr. Michèle DAILLOUX, MCU-PH,

Votre regard bienveillant et encourageant m'a donné la force qui me manquait parfois pour continuer dans cette voie. Votre présence me manque, mais je sais que vous seriez fière du chemin que j'ai parcouru. Recevez le témoignage de toute mon admiration.

A Dr. Patricia FRANCK, PH et au Dr. Catherine LAURAIN, PA,

Mener de front mon internat et ma thèse n'a pas été toujours de tout repos. Merci à toutes les deux pour tout : votre soutien indéfectible, votre présence à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments, votre enthousiasme pour ce métier qui est le nôtre. Recevez ici l'expression de mon amitié chaleureuse et sincère.

Au Pr. Jean-Michel PAWLOSKY, PU-PH, Laboratoire de Virologie et INSERM U841, Hôpital Henri Mondor, Créteil,

Je vous remercie chaleureusement de m'accueillir dans votre équipe, ainsi que pour la confiance et le soutien que vous m'accordez. Promis, à partir d'aujourd'hui, je ne parlerai plus que Virologie !

A Dominique, Stéphane, Magali, Christophe, mais aussi Liliane, Olivier, et Jérôme, Laboratoire de Virologie, Hôpital Henri Mondor, Créteil,

J'ai l'impression d'avoir toujours fait partie de la « famille », merci pour votre accueil et pour la place que vous m'avez faite parmi vous. C'est un grand bonheur de travailler avec vous.

A ma nouvelle « famille de recherche » : Alex, Rozenn, Hakim, Laetitia, Paul, Jenna, Coralie ...

Je tâtonne encore, mais je sais que vous êtes là. Merci.

A mes parents,

A ma sœur, Hélène,

A ma petite Mamie,

A toute ma famille : Mimy, Pascal, Sara, Isabelle, Fabien...

Merci tout simplement pour votre présence à mes côtés, grâce à vous, je sais qui je suis et d'où je viens.

A Marianne, ma complice de toujours,

Il y a ces moments d'euphorie, où on se sent capable de gravir les montagnes et de vaincre l'adversité. Il y a ces moments de doute, où l'on ne se sent plus capable d'avancer et où l'on se demande si la voie choisie était la bonne. Il y a ces moments de dégoût et de sentiment d'injustice, où l'on aimerait changer le monde... Dans tous ces moments là, et dans bien d'autres encore tu es là. Tu fais partie de ces personnes qui l'on souhaite croiser dans sa vie... Moi je t'ai trouvé, et maintenant que tu es là, je me sens plus forte. Merci.

A Magali,

Pour cette vie pimentée que nous partageons... Pour ta sagesse et ta sérénité, quand moi je suis impulsive et émotive... Notre amitié est sans faille, merci d'être toi.

A Céline,

Nous avons usé nos jeans sur les mêmes bancs de fac... et cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans ton soutien logistique (!). Merci.

A Géraldine, Anne-Lise, Aurore, Lorène, Isa, Marie, Anne, Maryse, Anne-Charlotte,

Mes amis d'enfance, de fac, d'internat, de labo... Merci pour tout...

A Catherine COLSON et Francine KEDZIEREWICZ,

Votre présence au laboratoire, votre bonne humeur, et nos discussions m'ont énormément apporté, merci.

A celui qui se reconnaîtra, en lisant ces mots : merci de la grande place que tu as occupé et que tu occuperas toujours dans ma vie.

Enfin je remercie tout ceux que j'ai rencontrés, ceux que je côtoie chaque jour, et ceux que je rencontrerai peut-être un jour quelque part, pour tout ce qu'ils m'apportent, et pour tout ce qu'ils m'apporteront.

SOMMAIRE

TABLE DES FIGURES et DES TABLEAUX	xiii
ABREVIATIONS	xxi
INTRODUCTION	1
OBJECTIFS DE LA THESE	8
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	11
<u>Chapitre I. Des molécules.</u>	12
I. Les antibiotiques : cibles et mécanismes d'action	12
1.1. Principes généraux et définitions	12
1.2. Classification, mécanismes d'action	17
1.3. Relations structure-activité	41
II. Les antiseptiques cationiques : cibles et mécanismes d'action	50
2.1. Classification	50
2.2. Mécanismes d'action	54
III. Composés cationiques antibactériens : quoi de neuf ?	61
3.1. Peptides antimicrobiens	61
3.2. De nouveaux composés ?	64
3.3. Un cas particulier : la platensimycine	69
IV. Les calixarènes	71
4.1. Une brève histoire des calixarènes	71
4.2. Les calixarènes étudiés dans ce travail	77
<u>Chapitre II. Des bactéries... Evolution et dissémination des résistances.</u>	79
I. Bactéries à Gram + et résistances	79
1.1. Staphylococoques et résistance à la méticilline	79
1.2. Entérocoques et résistance aux glycopeptides	84
1.3. Pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline	85
II. Bactéries à Gram – et résistances	87
2.1. Entérobactéries, BLSE et résistance aux fluoroquinolones	87
2.2. <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Burkholderia</i> spp. et multirésistance	91

<u>Chapitre III.</u> Et des Hommes ? Un point sur les infections nosocomiales.	94
I. Définitions	94
1.1. Origines	94
1.2. Facteurs favorisants	95
II. Enquêtes de prévalence	95
 PARTIE EXPERIMENTALE	 98
 <u>Chapitre I.</u> Activité antibactérienne & Cytotoxicité	 99
Grare et al., 2006, Pathologie Biologie. 54 :470-476.	
Grare et al., 2007a, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 60:575-581.	
 <u>Chapitre II.</u> Spectre d'activité	 103
Grare et al., 2009a, Clinical Microbiology and Infection. In press.	
 <u>Chapitre III.</u> CMI & Sels de tétrazolum	 107
Grare et al., 2008, Journal of Microbiological Methods. 75:156-159.	
 <u>Chapitre IV.</u> Cinétique d'activité & Bactéricidie	 109
Grare et al., 2009c, Pathologie Biologie. Soumis.	
 I. Objectifs	 110
II. Matériels & Méthodes	110
III. Résultats	113
IV. Discussion	119
 <u>Chapitre V.</u> Synergie (?) avec les antibiotiques	 121
I. Objectifs	122
II. Rappels bibliographiques	122
III. Matériels & Méthodes	127
IV. Résultats & Discussion	130
 <u>Chapitre VI.</u> Génération de mutants résistants	 144
I. Objectifs	145
II. Rappels bibliographiques	145
III. Matériels & Méthodes	148
IV. Résultats	151
V. Discussion	157

Chapitre VII. A la recherche de la ou des cible(s) d'action : approche micrométrique et nanométrique des propriétés pariétales. 159

Grare et al., 2007b, Pathologie Biologie. 55:465-471.

I.	Objectifs	160
II.	Rappels bibliographiques	160
III.	Matériels & Méthodes	160
IV.	Résultats	168
	4.1. Microélectrophorèse	168
	4.2. Microscopie à force atomique	173
V.	Discussion	178

Chapitre VIII. A la recherche de la ou des cible(s) d'action : modifications de la perméabilité membranaire ? 181

Grare et al., 2009b, Cytometrie part A. Soumis.

Chapitre IX. A la recherche de la ou des cible(s) d'action : Interactions avec le LPS et/ou le LTA. 185

I.	Objectifs	186
II.	Rappels bibliographiques	186
III.	Matériels & Méthodes	188
IV.	Résultats	191
V.	Discussion	192

DISCUSSION GENERALE	194
---------------------	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	222
-----------------------------	-----

ANNEXES	256
---------	-----

TABLE des FIGURES et des TABLEAUX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 : Principales cibles des antibiotiques.	12
Figure 2 : Paramètres pharmacodynamiques influençant l'action des antibiotiques.	15
Figure 3 : Evolution de l'effet antibactérien, en fonction de la concentration en antibiotique et du temps.	15
Figure 4 : Les associations d'antibiotiques. (A) Synergie ; (B) Antagonisme ; (C) Indifférence. Ctl : contrôle.	16
Figure 5 : Schéma de la synthèse du peptidoglycane, niveaux d'intervention des PLPs et cibles d'action des β -lactamines.	18
Figure 6 : Cible d'action des glycopeptides.	22
Figure 7 : Structure des glycopeptides, et des nouveaux lipoglycopeptides.	23
Figure 8 : Structure chimique (A) de la polymyxine B, (B) de la colistine.	25
Figure 9 : Proposition de mécanisme d'action de la daptomycine.	26
Figure 10 : Mécanisme d'action des quinolones.	27
Figure 11 : Interaction ADN-gyrase-fluoroquinolones.	27
Figure 12 : Voie de synthèse de l'acide tétrahydrofolique et niveau d'action des sulfamides et des diaminopyridines.	30
Figure 13 : Mécanisme d'action des MLSK.	32
Figure 14 : Sites de fixation au niveau ARN 23S.	32
Figure 15 : Structure de la télithromycine, céthromycine (ABT773), et du Kosan-1325.	34
Figure 16 : Mécanisme d'action du linézolide.	36
Figure 17 : Modélisation du site de fixation du linézolide.	36
Figure 18 : Mécanisme d'action des aminosides.	38
Figure 19 : Mécanisme d'action des tétracyclines.	39
Figure 20 : Interactions entre la tétracycline et la SU 30S du ribosome.	39

Figure 21 : Structure de la (a) tétracycline, (b) minocycline, (c) tigécycline.	40
Figure 22 : Exemples de relations structure-activité pour les céphalosporines.	42
Figure 23 : Genèse des fluoroquinolones.	43
Figure 24 : Structure du (a) chlorure de tétradécyltriméthylbenzylammonium (un des éléments du mélange, en C14) ; (b) bromure de tétradécyltriméthylammonium (cétrimide).	50
Figure 25 : Structure chimique de la chlorhexidine (a) et de l'alexidine (b).	52
Figure 26 : Structure générale des PHMB.	53
Figure 27 : Structures de propamidine (3), butamidine (4), pentamidine (5) et hexamidine (6).	53
Figure 28 : Principaux modes d'action des antiseptiques sur les bactéries.	55
Figure 29 : Schéma représentant les différentes étapes de l'interaction entre les ammoniums quaternaires et les membranes bactériennes.	56
Figure 30 : Représentation schématique de l'interaction de la chlorhexidine avec la membrane bactérienne.	58
Figure 31 : Représentation schématique de l'interaction des PHMB avec la membrane bactérienne.	59
Figure 32 : Exemple de diamidines interagissant avec les séquences riches en GC de l'ADN.	60
Figure 33 : Exemple de structure de peptides cationiques.	62
Figure 34 : Mode d'action des peptides cationiques antibactériens.	62
Figure 35 : Exemple de structure de céragénines.	64
Figure 36 : Exemple de structure des dérivés cationiques à structure stéroïque.	64
Figure 37 : Exemple de structure de dérivés obtenus à partir de la polymyxine.	65
Figure 38 : Exemple de structure de dérivés alkyldiméthyl amine N-oxides & N-alkylbétaines.	65
Figure 39 : Exemple de structure de sels de phosphonium di- et tri-méthylés.	66
Figure 40 : Exemple de structure de sels d'alkylpyridinium.	67
Figure 41 : Structure des dérivés 4,6-di(substitué)amino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine.	67

Figure 42 : Exemple de structure de lipopolyamines porteuses de gyanylhydrazones.	68
Figure 43 : Exemples de structure de type aryl-4-guanidinomethylbenzoate ou N-aryl-4-guanidinomethylbenzamide.	69
Figure 44 : A : Structure de la platensimycine et de la platencine. B : Platensimycine dans le site actif de FabF.	70
Figure 45 : Voie de synthèse des acides gras et niveau d'action de la platensimycine.	70
Figure 46 : Sites susceptibles d'être chimiquement modifiés sur un calix[4]arène.	72
Figure 47 : Les 4 conformations observées pour un calix[4]arène.	72
Figure 48 : Exemple de produits naturels contenant des fonctions guanidine.	77
Figure 49 : Structure des molécules étudiées dans cette thèse.	78
Figure 50 : Fréquence de SARM dans les différents pays d'Europe en 2007.	80
Figure 51 : <i>Enterococcus faecium</i> : fréquence de la résistance à la vancomycine (A) et <i>Enterococcus faecalis</i> : fréquence de la résistance de haut niveau aux aminosides (B) dans les différents pays européens en 2007.	85
Figure 52 : <i>Streptococcus pneumoniae</i> : fréquence de la résistance aux β -lactamines (PSDP) (A) et à l'érythromycine (B) en 2007.	86
Figure 53 : Distribution des sérogroupes et des profils de résistance (β -lactamines seules, MLS seules, les deux conjuguées).	86
Figure 54 : Répartition géographique mondiale des différentes BLSE de type CTX-M en 2006.	88
Figure 55 : Fréquence de la résistance aux C3G dans les différents pays européens en 2007. A : <i>E. coli</i> ; B : <i>K. pneumoniae</i> .	88
Figure 56 : Fréquence de la résistance aux fluoroquinolones dans les différents pays européens en 2007. A : <i>E. coli</i> ; B : <i>K. pneumoniae</i> .	90
Figure 57 : Répartition géographique mondiale des différents gènes qnr.	91
Figure 58 : <i>P. aeruginosa</i> : Fréquence de la résistance dans les différents pays européens en 2005. A : ceftazidime ; B : fluoroquinolones.	92

PARTIE EXPERIMENTALE

Figure 59 : Schéma du principe de la technique des courbes de bactéricidie.	112
Figure 60 : Exemple d'évolution de la croissance bactérienne lors de l'expérience de courbe de bactéricidie, sur <i>E. coli</i> ATCC 25922.	113
Figure 61 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur <i>E. coli</i> ATCC 25922, à 0,5x, 1x, 2x, 4x, et 8x la CMI sur une période de 24 h.	114
Figure 62 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur <i>E. coli</i> ATCC 25922, à 2x, 4x, et 8x la CMI sur une période de 24 h. Comparaison avec l'évolution du marquage IP/SYTO9, observation au microscope à fluorescence.	115
Figure 63 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 à 0,25x, 0,5x, 1x, 2x et 4x la CMI sur une période de 24 h.	116
Figure 64 : Aspect macroscopique du bouillon MHB après 24 h de croissance de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, en présence de 2xCMI de Cx1.	116
Figure 65 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 à 0,5x, 1x et 2x la CMI, sur une période de 24 h. Comparaison avec l'évolution du marquage IP/SYTO9, observation au microscope à fluorescence.	117
Figure 66 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur <i>S. aureus</i> ATCC 25923 à 0,5x, 1x, 2x et 4x la CMI sur une période de 24 h. Comparaison avec l'évolution du marquage IP/SYTO9, observation au microscope à fluorescence.	118
Figure 67 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur <i>S. aureus</i> ATCC 29213 à 0,5x, 1x, 2x et 4x la CMI sur une période de 24 h. Comparaison avec l'évolution du marquage IP/SYTO9, observation au microscope à fluorescence.	119
Figure 68 : Schéma de la plaque obtenue lors de la réalisation du test de synergie par la technique de l'échiquier.	128
Figure 69 : Schéma des différents profils obtenus : synergie, addition, indifférence, antagonisme.	129
Figure 70 : Représentation schématique des interactions obtenues selon les genres bactériens (4 souches/genre). A : <i>E. coli</i> ; B : <i>S. aureus</i> ; C : <i>P. aeruginosa</i> .	130

Figure 71 : Evolution de la CMI lors d'expositions répétées au Cx1 pour <i>E. coli</i> ATCC 25922 (n = 6).	151
Figure 72 : Evolution de la CMI après arrêt de la pression de sélection pour <i>E. coli</i> ATCC 25922 (n = 6).	151
Figure 73 : Aspect microscopique de la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922 après 1 à 30 passages en présence de Cx1.	152
Figure 74 : Evolution de la taille et de la granulosité de la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922, au cours des passages (analyse FSC/SSC par cytométrie en flux) (n = 2).	153
Figure 75 : Cytogrammes de répartition FSC/SSC (en log10).	153
Figure 76 : Evolution de la taille et de la granulosité de la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922, après arrêt de la pression de sélection (analyse FSC/SSC par cytométrie en flux) (n = 2).	154
Figure 77 : Evolution de la susceptibilité d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 aux antibiotiques (CMI) au cours des passages.	154
Figure 78 : Evolution de la CMI pour <i>S. aureus</i> ATCC 29213 en présence de Cx1 (n = 6).	155
Figure 79 : Evolution de la CMI après arrêt de la pression de sélection pour <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (n = 6).	155
Figure 80 : Evolution de la CMI pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 en présence de Cx1 (n = 6).	156
Figure 81 : Evolution de la CMI après arrêt de la pression de sélection, pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (n = 6).	156
Figure 82 : Evolution de la production de pigments pyocyaniques au cours de la sélection de mutants, pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (n=6).	157
Figure 83 : Schéma simplifié de l'appareillage de microélectrophorèse.	162
Figure 84 : Fenêtre de capture de la mobilité électrophorétique.	163
Figure 85 : Exemple d'histogramme de répartition des bactéries en fonction de leur mobilité, obtenu pour <i>P. aeruginosa</i> .	163
Figure 86 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique. Courbes obtenues pour <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>E. faecalis</i> ATCC 25922 & <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.	168

Figure 87 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique. Courbes obtenues pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 avant et après traitement (moyenne sur n = 4).	168
Figure 88 : Courbes obtenues pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 après traitement par (A) : hexamidine ; (B) : ticarcilline ; (C) : mCx1 ; (D) : Cx1.	169 170
Figure 89 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique. Courbes obtenues pour <i>E. coli</i> ATCC 25922 avant et après traitement.	171
Figure 90 : Courbes obtenues pour <i>E. coli</i> ATCC 25922 après traitement par l'hexamidine.	171
Figure 91 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique. Courbes obtenues pour <i>S. aureus</i> ATCC 29213 avant et après traitement.	172
Figure 92 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique. Courbes obtenues pour <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 avant et après traitement.	172
Figure 93 : Images AFM en mode contact d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 non traitée.	173
Figure 94 : Courbe de force obtenue pour <i>E. coli</i> ATCC 25922 non traitée en comparaison à celle obtenue pour le support (lame de verre + PEI).	173
Figure 95 : Courbe de force obtenue pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 non traitée en comparaison à celle obtenue pour le support (lame de verre + PEI).	174
Figure 96 : Comparaison des courbes d'indentation obtenues pour <i>E. coli</i> ATCC 25922 non traitée et <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 non traitée.	175
Figure 97 : Images en mode contact obtenues pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.	176
Figure 98 : Comparaison des courbes d'indentation obtenues pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 non traité et après 24 h de contact avec hexamidine (32 mg/L), mCx1 (512 mg/L) et Cx1 (32 mg/L).	177
Figure 99 : Validation du marquage par le kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting, pour <i>S. aureus</i> ATCC 29213.	182
Figure 100 : Evolution de la taille et de l'hétérogénéité de la structure pour <i>S. aureus</i> ATCC 29213, après traitement par la pénicilline G.	183
Figure 101 : Evolution de la taille et de l'hétérogénéité de la structure pour <i>S. aureus</i> ATCC 29213, après traitement par la gentamicine.	183
Figure 102 : Evolution de la taille et de l'hétérogénéité de la structure pour <i>S. aureus</i> ATCC	184

29213, après traitement par la chlorhexidine.

Figure 103 : Evolution de la taille et de l'hétérogénéité de la structure pour <i>S. aureus</i> ATCC 29213, après traitement par le Cx1	184
Figure 104 : Schéma de la plaque obtenue pour le test d'affinité LPS/LTA.	190
Figure 105 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 32 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LPS de <i>E. coli</i> O55:B5 (n = 3).	191
Figure 106 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 256 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LPS de <i>E. coli</i> O55:B5 (n = 3).	191
Figure 107 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 32 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LPS de <i>P. aeruginosa</i> (n = 3).	192
Figure 108 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 256 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LPS de <i>P. aeruginosa</i> (n = 3).	192
Figure 109 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 32 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LTA de <i>S. aureus</i> (n = 3).	193
Figure 110 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 256 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LTA de <i>S. aureus</i> (n = 3).	193
Tableau II : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (n=4).	131
Tableau III : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour EcR1 (Pénicillinase acquise) (n=4).	132
Tableau IV : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour EcR2 (Céphalosporinase hyperproduite) (n=4).	133
Tableau V : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour EcR3 (BLSE) (n=4).	134
Tableau VI : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (n=4).	135
Tableau VII : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour SaR1 (SARM, pas de résistances associées) (n=4).	136

Tableau VIII : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour SaR3 (SARM, KT R, Ofloxacin R) (n=4).	137
Tableau IX : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour SaR4 (SARM, KT R, MLSB constitutif, Ofloxacin R) (n=4).	138
Tableau X : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (n=4).	139
Tableau XI : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour PaR2 (n=4).	140
Tableau XII : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour PaR3 (n=4).	141
Tableau XIII : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour PaR5 (n=4).	142

ABBREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
AFM	« Atomic Force Microscopy »
AFSSAPS	Agence Française de la Sécurité Sanitaire, des Aliments et des Produits de Santé
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARN	Acide Ribo-Nucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ATB	Antibiotique
ATCC	« American Type Culture Collection »
BLSE	Bêta-Lactamase à Spectre Etendu
BMR	Bactéries Multi-Résistantes
BPCO	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
C1G, C2G, C3G, C4G	Céphalosporines de 1 ^{ère} , 2 ^{ème} , 3 ^{ème} ou 4 ^{ème} générations
CA-ESBL	« Community-Acquired Extended Spectrum Beta-Lactamase »
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CA-MRSA	« Community-Acquired Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> »
CC50	Concentration Cytotoxique 50%
CDC	« Center for Diseases Control »
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CHUN	Centre Hospitalier Universitaire de Nancy
CHX	Chlorhexidine
CI50	Concentration Inhibitrice 50%
CLSI	« Clinical Laboratory Standards Institut »
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMC	« Critical Micelle Concentration »
CMF	Cytométrie en flux
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPM	Concentration de Prévention des Mutations
Cx1	Para-guanidino-éthylcalix[4]arène
DI	Dénomination Internationale
DPX	Dansyl-polymyxine B
E	Module de Young

EARSS	« European Antimicrobial Resistance Surveillance System »
EBLSE	Entérobactéries productrices de BLSE
ECET	<i>Escherichia coli</i> entéro-toxinogènes
ELISA	« Enzyme Linked Immunosorbent Assay »
ENP	Enquête Nationale de Prévalence
EMRSA	« Epidemic Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> »
ERG	Entérocoques Résistants aux Glycopeptides
ERV	Entérocoques Résistants à la Vancomycine
FBC	« Fractional Bactericidal Concentration »
FDA	« Food and Drug Administration »
FIC	« Fractional Inhibitory Concentration »
FSC	« Forward SCatter »
GalA	Acide galacturonique
HA-MRSA	« Hospital-Acquired Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> »
HCA-MRSA	« Healthcare-Associated Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> »
Hep	heptopyranose
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HX	Hexamidine
IAS	Infections Associées aux Soins
ICAAC	« Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy »
IN	Infections Nosocomiales
INT	2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride
IP	Iodure de Propidium
IS	Index de Sélectivité
ISO	Infections du Site Opératoire
kB	Constante de raideur de la bactérie
kC	Constante de raideur de la pointe d'AFM
Kdo	2-keto-3-deoxy-D-manno-octonate
LAM	Lipoarabinomannane
LCPME	Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement
LPS	Lipopolysaccharide
LPV	Leucocidine de Panton Valentine
LSM3	Laboratoire de Sécurité Microbiologique de niveau 3
LTA	Acide lipoteichoïque
M	moles/L

mAGP	Mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane
ME	Membrane externe
MC	Membrane cytoplasmique
mCx1	Para-guanidinoéthylphénol
MH	Mueller Hinton
MLS	Macrolides-Lincosamides-Synergistines
MLSK	Macrolides-Lincosamides-Synergistines-Kétolides
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NNIS	« National Nosocomial Infections Surveillance system »
PABA	Acide para-aminobenzoïque
PBP	« Penicillin Binding Proteins »
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PEI	Polyéthylène imine
PG	Peptidoglycane
PHMB	PolyHexaMéthylène Biguanides
PLP	Protéines Liant les Pénicillines
PSDP	Pneumocoque de Sensibilité Diminuée à la Pénicilline
QAC	« Quaternary Ammonium Compound »
QNR	« Quinolone Resistance determinant »
QRDR	« Quinolone Resistance-Determining Region »
RAISIN	Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales
RCP	Résumé des Caractéristiques du Produit
RICAI	Réunion Interdisciplinaire en Chimiothérapie Anti-Infectieuse
RN	Rouge Neutre
RSA	Relations Structure-Activité
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensible à la Méricilline
SCN	Staphylocoques à Coagulase Négative
SCN-MR	Staphylocoques à Coagulase Négative Méricillino-Résistants
SCN-MS	Staphylocoques à Coagulase Négative Méricillino-Sensibles
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SHA	Solutions Hydro-Alcooliques
SSC	« Side Scatter »
ssDNA	Single-stranded Desoxyribonucleic acid

SU	Sous-Unité
TKC	« Time Kill Curve »
TLR	« Toll Like Receptor »
TNF	« Tumor Necrosis Factor »
UDP	Uridine Di-Phosphate
UFC	Unité Formant Colonie
USI	Unité de Soins Intensifs
VISA	« Vancomycin-Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i> »
VRSA	« Vancomycin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> »

INTRODUCTION

FAUT-IL DEVELOPPER DE NOUVEAUX ANTIBIOTIQUES ?

Les antibiotiques sont une des grandes découvertes du 20^{ème} siècle. Les antibiotiques, qu'ils soient naturels ou synthétiques, sont à l'origine d'une diminution significative de la morbidité et de la mortalité consécutives aux infections bactériennes. Cependant, l'arrivée de cette « panacée » a eu de mauvaises conséquences : prescriptions inappropriées, doses inadaptées, intervalles ou durées d'administration non respectées... Cet usage intensif et inadapté, conjugué à une utilisation excessive en agroalimentaire, ont conduit à l'émergence de bactéries multirésistantes (BMR). De nombreux auteurs ont décrit ce phénomène comme marquant la fin de l'ère de l'antibiothérapie, et le terme « super bugs » est entré dans le vocabulaire courant pour décrire les souches telles que les Entérocoques Résistants aux Glycopeptides (ERG), les *Staphylococcus aureus* Résistants à la Méricilline (SARM), ou les *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants. Or, les laboratoires pharmaceutiques ont pratiquement cessé la recherche de nouveaux antibactériens, jugée non rentable et non nécessaire à une époque où nous disposons de pléthore de molécules, et où les résistances développées par les bactéries étaient encore considérées comme sporadiques. La prise de conscience de la gravité de la situation est récente. Quel(s) scénario(s) peut-on ou doit-on envisager ?

La problématique actuelle

Historiquement, le 1^{er} antibiotique découvert est la pénicilline, découverte par un élève de l'Ecole du Service de Santé Militaire de Lyon, Ernest Duchesne, qui avait, dans son travail de thèse en 1897, décrit les propriétés anti-infectieuses d'un bouillon de culture de moisissures du genre *Penicillium* ; mais ce n'est qu'après la publication des travaux de Fleming que fut retrouvé ce travail oublié. La pénicilline G (ou benzylpénicilline), redécouverte par Alexander Fleming en 1929, chez *Penicillium notatum* fut plus tard extraite de cultures de *Penicillium chrysogenum*, plus productif. Mais c'est à l'acharnement de Howard Florey, et un peu plus tard, Ernst Boris Chain, que l'on doit la naissance du médicament « pénicilline ». Le 12 février 1941, un homme atteint d'une septicémie à *Staphylococcus* spp. est guéri en 24 h. Pour identifier plus précisément la moisissure qu'il utilise, Florey et son équipe partent aux Etats Unis, accueillis dans l'Illinois par le mycologiste Charles Thom qui met à leur disposition une installation de brasseur de bières ! Puis, sur les conseils de Waksman, qui découvrira la streptomycine en 1948, les compagnies pharmaceutiques Merck, Pfizer, Squibb, Lederle acceptent d'engager des recherches en vue de l'exploitation industrielle. Depuis cette 1^{ère} découverte, et commercialisation, la recherche s'est enclenchée : découverte de nouvelles molécules naturelles,

modification par voie d'hémisynthèse, ou recherche de nouveaux composés non présents dans la Nature, par pure synthèse chimique.

Dans les années 60, les antibiotiques sont apparus comme une révolution : on guérissait en quelques jours des infections autrefois mortelles, les blessures infectées et les intoxications alimentaires n'étaient plus considérées comme irrémédiables, des maladies comme la syphilis ou la gonorrhée paraissaient en voie d'éradication ; et on maîtrisait désormais des fléaux anciens tels que la peste et le choléra [Hansen & Freney, 2002]. L'Homme a cru que la bataille contre les Bactéries était gagnée... Peut-être avec un enthousiasme un peu précocé et présomptueux... En effet, aujourd'hui, les résistances aux antibiotiques et aux antiseptiques ne sont plus un mythe : elles ont émergé aux quatre coins du globe, se disséminent, et se propagent avec une facilité déconcertante ; cela touche non seulement le monde hospitalier, où cette émergence est facilitée par la proximité entre patients fragilisés et l'importante pression de sélection antibiotique, mais aussi en milieu communautaire où la prescription irraisonnée d'antibiotiques a aussi fait des ravages.

L'âge d'or des antibiotiques a duré un demi-siècle, mais la chute est rapide... Parallèlement à l'émergence de bactéries résistantes, voire multirésistantes (BMR), le filon antibiotique s'épuise. Force est de constater que des molécules promises au succès d'antan, ne seront que des demi-succès, voire de véritables désillusions : céfépime, cefpirome, méropénème, ticarcilline-acide clavulanique, aztréonam, isépamicine... Les antibiotiques mettent beaucoup plus longtemps qu'avant pour s'imposer (association pipéracilline-tazobactam ou daptomycine, par exemple). En parallèle à ce manque cruel d'innovations et de commercialisation, le déclin s'est amorcé pour des molécules dont les indications étaient identiques : ainsi, pour 12 dénominations internationales (DI) disponibles pour les C₃G injectables au début des années 90, il n'en reste plus que 5 aujourd'hui. Cela concerne aussi les molécules dont les indications se réduisent, du fait d'une volonté commune des autorités et des professionnels de santé, de réduire la pression de sélection antibiotique. Certaines pathologies telles que les rhinopharyngites ou les angines non streptococciques ne justifient pas de telles prescriptions. Les C₁G (orales et injectables), les C₃G orales et les macrolides sont les principales familles touchées par cet usage raisonné [Trémolières et al., 2005]. Une des illustrations les plus parlantes des échecs de développement en antibiothérapie est certainement la famille des fluoroquinolones. En effet, une vingtaine de molécules ont vu le jour, jusqu'à des stades plus ou moins avancés de développement, l'un des principaux objectifs étant l'extension du spectre aux cocci à Gram +, en particulier *Streptococcus pneumoniae* (allait-on trouver un antibiotique actif sur la quasi-totalité des pathogènes

en cause dans les infections respiratoires communautaires ?). Quatre produits furent retirés du marché après 4 à 18 mois de commercialisation (témafloxacin, sparfloxacin, grépafoxacin, trovafoxacin) pour des raisons d'intolérance ou de toxicité grave (cardiaque, hépatique, tendinopathies...). Avec un recul de 12 ans, seules deux molécules restent disponibles : lévofloxacin et moxifloxacin [Trémolières et al., 2005]. Mais afin de ne pas les utiliser de manière excessive pour prévenir le développement des résistances, leur utilisation en traitement de 1^{ère} intention, chez un patient sans facteur de risque et en absence de gravité, n'est pas recommandée. En dehors de ces deux nouvelles quinolones, les nouvelles mises sur le marché de ces dix dernières années sont très réduites :

- **Ertapénème (INVANZ®)** : actif sur les cocci à Gram +, excepté les SARM, les entérocoques, et sur les bacilles à Gram -, sauf *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. Son usage est réservé (en 2^{ème} intention) aux infections intra-abdominales et gynécologiques, ainsi que le pied du diabétique.
- **Linézolide (ZYVOXID®)** : actif uniquement sur les cocci à Gram +, 1^{er} représentant d'une nouvelle classe thérapeutique, les oxazolidinones. Mais son usage reste limité du fait d'une hématotoxicité par myélosuppression.
- **Télithromycine (KETEK®)** : proche des macrolides, recommandé dans les exacerbations de broncho-pneumopathie obstructive chronique (BPCO), les pneumonies de gravité légère et les sinusites aiguës maxillaires.
- **Daptomycine (CUBICIN®)** : exclusivement active sur les cocci à Gram +, son utilisation est actuellement limitée aux endocardites du cœur droit chez le toxicomane et les bactériémies à SARM sur cathéter.
- **Tigécycline (TYGACIL®)** : antibiotique à large spectre, mais bactériostatique (activité dans les infections graves en réanimation non validée).
- **Quinupristine-dalfopristine (SYNERCID®)** : usage réservé au milieu hospitalier, et très peu utilisée du fait d'une veinotoxicité, nécessitant l'administration par voie veineuse centrale.

Ces nouvelles molécules ont des indications très restreintes, ne stimulant pas la recherche par les industries pharmaceutiques... question de rentabilité ! Et certains auteurs continuent à penser que « c'est parfois encore avec du vieux qu'on fait du neuf », en pensant à la colistine, la clindamycine ou

la fosfomycine, antibiotiques des années 60 que l'on redécouvre du fait de leur activité persistante [May, 2008].

Pouvions nous prévoir cette dramatique disparition des antibiotiques ? En 1992, Stuart B. Levy a publié « the antibiotic paradox », livre au sous-titre provocant « how miracle drugs are destroying the miracle ». On lit par exemple page 183 : « Cette situation [l'augmentation des résistances] fait naître l'hypothèse stupéfiante que le temps viendra où les antibiotiques ne seront plus qu'un fait d'intérêt historique ». Dramatique ? Stupéfiant ? Oui, mais pourquoi alors cette prise de conscience est-elle si tardive ? Plus inquiétant encore, dès 1996, de grandes firmes commencent à se désengager de la recherche sur les antibiotiques. Mais c'est en 2002, que souvent à l'occasion de restructuration, de concentration, d'absorption ou de fusion, on assiste à l'abandon de molécules en cours de développement : gémifloxacine (GSK), garénoxacine (BMS), un kétolide ABT 773 (Abbott), un glycopeptide LY 333328 (Eli-Lilly), une oxazolidinone, l'éprezolide (Pfizer), l'évérmicine (Schering-Plough)... Et on pourrait encore ajouter d'autres exemples ! Plus grave encore est la mise en sommeil quasi-complète de la recherche... Dans un article récent, judicieusement intitulé « Bad buds, no drugs : no ESKAPE ! », l'IDSA (« Infectious Diseases Society of America ») tire une nouvelle fois la sonnette d'alarme [Boucher et al., 2009]. Les résultats de leurs investigations chez de grands groupes pharmaceutiques, tels que Abbott, AstraZeneca, Bayer, GSK, Lilly, Merck, Novartis, Johnson&Johnson, Pfizer, Roche, Sanofi Aventis, Shering Plough ou Wyeth sont stupéfiants. De ces 13 leaders pharmaceutiques, seuls 3 nouveaux composés sont avancés en terme de recherche clinique : ceftobiprole, dalbavancine et PTK-0796 (aminométhylcycline). Le très faible nombre d'antibactériens en phase II ou III de recherche clinique dans ces compagnies majeures, qui sont les leaders internationaux en terme de découverte de molécules anti-infectieuses, et de développement, est le reflet criant du désintérêt croissant des industriels dans cette aire thérapeutique [Boucher et al., 2009]. En 2007, les molécules enregistrées auprès du NIH et de la FDA, comprenaient 388 médicaments anti-infectieux et vaccins, et 83 molécules antibactériennes en développement. Une lecture attentive de cette liste met en lumière que la plupart de ces molécules sont en phase pré-clinique ou phase I ; et que parmi ces composés figurent un grand nombre d'antibactériens topiques et non absorbables, et certains composés dont le développement a été arrêté prématurément. Encore plus inquiétant, parmi ces molécules, peu de nouveautés, et une quasi-absence des mécanismes d'action innovants ! La plupart des molécules enregistrées sont des antibiotiques déjà approuvés par la FDA, et que ne sont étudiés que pour de nouvelles indications [Boucher et al., 2009]. Ce qui est

sûr, c'est que le nombre de nouveaux antibiotiques a décru précipitamment ces 25 dernières années. Une diminution de près de 75% a été observée concernant les antibiotiques par voie systémique approuvés par la FDA entre 1983 et 2007, et que cette diminution est particulièrement importante depuis 5 ans (2003-2007) [Spellberg et al., 2008]. Seuls 5 firmes pharmaceutiques (GSK, Novartis, AstraZeneca, Merck et Pfizer) ont encore des programmes actifs de recherche dans le domaine des antibactériens, et le nombre d'essais cliniques enregistrés auprès de ClinicalTrials.gov, sont en constante diminution, depuis 2005 [Taubes, 2008 ; Karlberg, 2008]. Pourquoi ce désintérêt ? Pour le marketing d'une firme, les antibiotiques ont le grave inconvénient de « guérir la maladie », et, sauf cas particuliers, il s'agit de traitements courts. Le souci de l'émergence de résistances conduit à préserver l'intérêt collectif, sans nuire à l'intérêt individuel : un des moyens de contribuer à la prévention des résistances est de ne prescrire des antibiotiques qu'aux patients qui en ont besoin, et par des traitements de durée adaptée à l'infection traitée (ni trop long, ni trop court). Ceci suppose de renforcer les procédures diagnostiques permettant de passer d'un traitement incertain (dans le doute, ça ne peut pas nuire, et le prescripteur ne s'abstient pas), à la prescription argumentée. Cependant, cela conduit à un moindre usage des antibiotiques, et donc à une moindre rentabilité pour les firmes pharmaceutiques, d'autant plus si on prend en considération le coût du développement d'une nouvelle molécule.

Nouvelles molécules et nouvelles cibles

La nécessité de découvrir de nouveaux antibactériens, que leur usage soit topique (antiseptique) ou par voie générale (antibiotique), est toujours plus pressante. La tendance actuelle dans le design de composés antibactériens, est d'abord de mieux comprendre le processus infectieux, les réactions de l'hôte et les mécanismes de résistance des bactéries à un niveau moléculaire. L'approche plus traditionnelle consiste à développer des molécules analogues à celles déjà utilisées en clinique, en modifiant la structure chimique de sorte à optimiser l'activité et les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Aujourd'hui, la plupart des nouveaux antibactériens ont été mis au point dans un objectif de ciblage de facteurs spécifiques portés par les bactéries résistantes, ou dans le cadre de la recherche de cibles encore inexplorées. La capacité des bactéries à s'adapter rapidement aux changements environnementaux tels que la température, l'osmolarité, la présence de nutriments est essentielle à leur survie. Les facteurs de virulence (production de toxines, facteurs d'adhésion, capsule, sidérophores, variation antigénique...) sont autant de cibles potentielles. Il est indispensable,

aujourd'hui, de découvrir une cible, nouvelle, moins susceptible d'induire une réponse adaptative de type résistance.

Prenons l'exemple de la réplication de l'ADN. Des enzymes autres que les topoisomérases II et IV (cibles des fluoroquinolones) font l'objet de travaux. Des inhibiteurs des différentes sous-unités de la polymérase III holoenzyme, des hélicases ou encore de la primase, pourraient donner dans l'avenir, de nouvelles classes d'antibiotiques (ces inhibiteurs du système SOS seront discutés plus tard) [Desnottes, 1999]. La division cellulaire, au cours de la multiplication bactérienne, reste quant à elle une voie encore trop peu explorée. Une autre voie (la synthèse des protéines), certes la plus explorée jusqu'à alors, donne encore l'accès à des cibles enzymatiques non encore exploitées, intervenant aussi bien lors de la phase d'initiation (méthionine-ARNt-synthétase, formyltransférase), d'élongation/maturation (EF-Tu, peptidyl-transférase, aminoacyl-ARNt-synthétase, peptidyl-ARNt-hydrolase, déformylase, méthionine-aminopeptidase), que de terminaison [Desnottes, 1999].

Enfin, des composés perméabilisants (polymyxine, surfactants) ou encore des molécules chélatant ou déplaçant les cations divalents de surface (polymyxine nonapeptide, dibromopropamidine, hexamétaphosphate...) facilitent le passage d'autres molécules. Des produits nouveaux dans ce domaine et utilisables par voie systémique en association, pourraient donner une 2^{ème} jeunesse à des antibiotiques existants théoriquement à large spectre, mais qui ne peuvent atteindre leur cible chez la majorité des bactéries à Gram -.

En conclusion, il faut s'employer à développer des molécules antibactériennes innovantes, échappant à la résistance croisée avec des familles de molécules disponibles. Il ne faut cependant pas oublier que les bactéries, même si parfois elles mettent du temps, trouvent toujours une parade à quelque mécanisme d'action d'antibiotique que ce soit. La recherche doit donc continuer sa marche en avant, en essayant de toujours garder une longueur d'avance sur ces petites bêtes... qui ont (heureusement) une capacité d'adaptation très supérieure à la nôtre !

OBJECTIFS DE LA THESE

C'est dans ce contexte (pénurie d'antibiotiques et multirésistance des bactéries) et dans cette optique (la recherche de nouvelles molécules antibactériennes) que se situe ce travail de thèse...

Au sein des différentes voies de recherche actuellement en développement dans notre équipe, une est consacrée aux calixarènes. Ce sont des composés purement synthétiques, macrocycles aromatiques constitués de n unités phénoliques ($n=4$ à 16), para-substituées ou non, reliées entre elles par des ponts méthyléniques. Les entités qui nous intéressent comportent 4 unités phénoliques, et sont par conséquent appelées calix[4]arène. Un candidat potentiel s'est révélé en la molécule nommée para-guanidinoéthylcalix[4]arène, que nous nommerons Cx1 par souci de simplification, calix[4]arène surmonté sur sa couronne supérieure de 4 fonctions guanidinium. A partir de ce candidat, nous nous sommes posés diverses questions et avons en conséquence poursuivi différents axes de recherche :

- 1) Le Cx1 possédait-il une activité antibactérienne intéressante ? (évaluation sur une collection de souches de référence ATCC)
- 2) Si oui, cette activité était-elle conservée sur des isolats cliniques résistants aux antibiotiques utilisés en routine ? (évaluation sur une collection d'isolats cliniques, isolés pour la plupart d'infections nosocomiales)
- 3) Si l'activité antibactérienne est intéressante, le composé est-il toxique ? (tests de viabilité et de cytotoxicité sur deux lignées de cellules eucaryotes humaines, HaCaT et MRC-5)

En effet, il est primordial, nous l'avons souligné dans l'introduction, qu'un nouveau composé soit non seulement actif, mais aussi non toxique. Trop d'exemples existent d'impasses de développement pour cause d'effets indésirables, parfois graves. La balance tolérance/efficacité doit être un « leitmotiv » permanent en recherche de thérapeutique humaine, quel que soit le domaine concerné.

- 4) Partons alors du postulat que nous avons entre nos mains une molécule active, non toxique. Quel peut-être son mécanisme d'action ? Pour répondre à cette question, nous avons exploré la ou les cible(s) d'action à la fois à l'aide de techniques dites classiques (courbes de cinétiques, test de synergie). Mais aussi grâce à des techniques plus innovantes (microélectrophorèse, microscopie à force atomique, cytométrie en flux...).
- 5) En parallèle, nous avons souhaité connaître le pouvoir de génération de mutants résistants de notre molécule. Quelle dose ? A quel délai ? Sur quelle bactérie ? pouvions-nous observer l'apparition de résistances *in vitro* ?

- 6) Enfin, afin d'ouvrir ce travail à de nouvelles perspectives, nous avons développé une réflexion sur les relations structure-activité (RSA) (exploration de diverses familles de composés cationiques, linéaires, monomères, calixarènes, amidine, guanidine, longueur de chaîne et importance des substitutions...).

Le fil de ce manuscrit suivra la réponse à ces questions, la progression de nos réflexions et de notre questionnement au cours de ce travail. Car à chaque réponse, surgissaient de nouvelles questions qui nous ont permis d'avancer et ouvre un horizon immense pour de futurs développements.

Une 1^{ère} partie bibliographique sera consacrée aux relations structure-activité et aux différentes cibles d'action (antibiotiques et antiseptiques), et à une revue de ce qui se fait actuellement en terme de composés cationiques antibactériens. Nous exposerons ensuite les travaux effectués (protocoles et résultats) avec comme support les articles publiés, acceptés ou soumis à ce jour. Enfin, nous ouvrirons la discussion sur le potentiel du Cx1 en tant que nouvel antibactérien, et sur l'intérêt des études de relations structure-activité.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

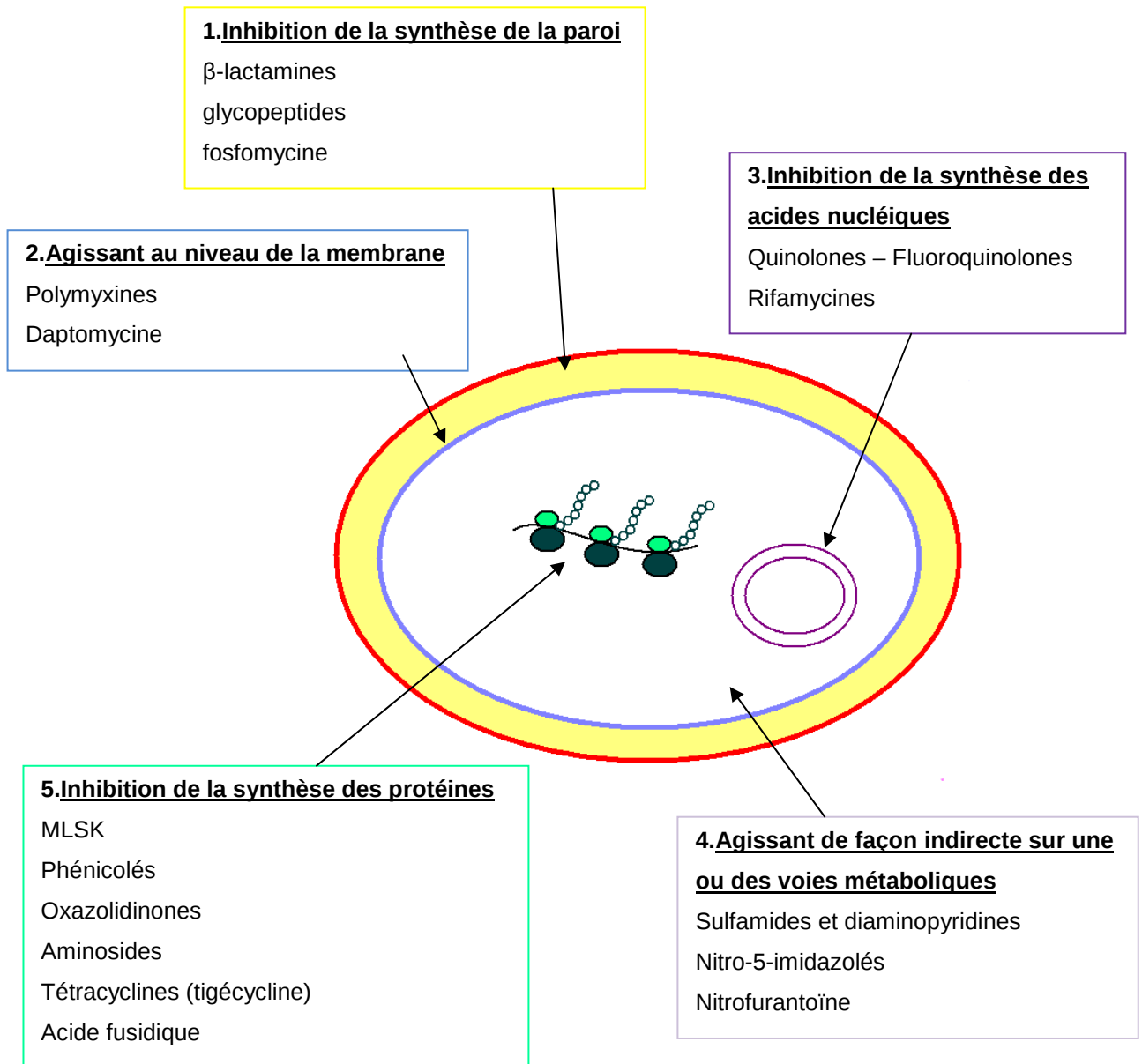


Figure 1 : Principales cibles des antibiotiques.

CHAPITRE I. DES MOLÉCULES...

ANTIBIOTIQUES, ANTISEPTIQUES, NOUVELLES MOLÉCULES CATIONIQUES

I. Les antibiotiques : cibles et mécanismes d'action

1.1. Principes généraux et définitions

1.1.1. Cibles d'action

La classification par famille regroupe les antibiotiques apparentés par leur structure chimique et leur cible d'action. Les cibles d'action sont diverses et intéressent les différents éléments d'une bactérie (Figure 1) :

(1) Inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane

- Inhibition de la synthèse de précurseurs de la paroi : fosfomycine
- Inhibition du transfert des précurseurs de la paroi sur un lipide porteur, permettant leur transport à travers la membrane plasmique : bacitracine
- Inhibition de l'insertion des unités glycaniques, précurseurs de la paroi, et de la transpeptidation :
 - ↳ les β -lactamines, qui inhibent les transpeptidases et transglycosylases responsables de l'assemblage des différents éléments constitutifs du peptidoglycane,
 - ↳ les glycopeptides, qui se lient au D-Ala/D-Ala du précurseur pentapeptidique du peptidoglycane.

(2) Action au niveau de la membrane cytoplasmique : polymyxines (détergents cationiques), daptomycine.

(3) Inhibition de la synthèse des acides nucléiques

- Inhibiteurs de l'ARN polymérase : rifamycines
- Inhibiteurs de l'ADN-gyrase et de la topoisomérase IV : quinolones et fluoroquinolones
- Inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique : sulfamides et diaminopyridines

(4) Inhibition de la synthèse protéique

Différentes familles d'antibiotiques agissent en interférant avec la synthèse protéique bactérienne, et ce, au niveau de l'une des trois étapes principales de la traduction : l'initiation, l'élongation ou la terminaison. Les ribosomes procaryotes présentent un coefficient de sédimentation de 70S (50S pour la grande sous-unité et 30S pour la petite sous-unité). La sous-unité 50S comporte les ARN ribosomaux (ARNr) 5S et 23S alors que la sous-unité 30S intègre l'ARNr 16S (impliqué dans la reconnaissance de l'ARN messager, aboutissant à l'initiation de la traduction).

1.1.2. CMI, CMB, catégorisation clinique des souches bactériennes

☐ L'activité antibactérienne est caractérisée *in vitro* par [Calop et al., 2008] :

- la **Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)** : concentration minimale d'antibiotique pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible après 18 à 24 h d'incubation à 35°C.
- la **Concentration Minimale Bactéricide (CMB)** : concentration minimale d'antibiotique laissant un nombre de survivants inférieur ou égal à 0,01% (diminution de 3 logs) d'un inoculum standardisé à 10^5 - 10^6 bactéries/mL.

Le **rapport CMB/CMI** permet de caractériser le type d'activité d'un antibiotique donné [Denis et al., 2008] :

- $CMB/CMI \leq 2$: antibiotique bactéricide
- CMB/CMI 4 à 16 : antibiotique bactériostatique
- $CMB/CMI > 16$: bactérie dite tolérante à l'antibiotique

Les β -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones sont des antibiotiques bactéricides, tandis que les macrolides, lincosamines, synergistines, tétracyclines, phénicolés... sont bactériostatiques.

☐ Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : sensible (S), intermédiaire (I), résistante (R), bien que les populations ne soient pas toujours homogènes [CA-SFM, 2008].

› **Souches sensibles** : les souches catégorisées (S) sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cadre d'un traitement par voie systémique, avec la posologie recommandée dans le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP).

› **Souches intermédiaires** : les souches catégorisées (I) sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. En effet, ces souches peuvent présenter :

- un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible ; cependant, *in vivo*, une partie de ces souches apparaît résistante au traitement ;
- un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier une classification dans la catégorie (R), mais suffisamment faible pour espérer un succès thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations ou posologies accrues).

La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.

› **Souches résistantes** : les souches catégorisées (R) sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quelque soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.

La détermination de ces catégories cliniques nécessite la définition de deux concentrations critiques : la **concentration critique basse « c »**, et la **concentration critique haute « C »**, auxquelles correspondent des diamètres critiques « d » et « D », respectivement. Les valeurs de « c », « C », « d » et « D » sont établies en tenant compte de plusieurs paramètres [CA-SFM, 2008].

- la distribution des CMI pour des populations de souches définies et appartenant à chacune des espèces bactériennes impliquées en pathologie humaine ;
- les concentrations humorales et tissulaires qui sont obtenues avec les posologies recommandées par le résumé des caractéristiques du produit (RCP) rédigé par l'AFSSAPS (Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Aliments et des Produits de Santé) ;
- la confrontation des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* (essais cliniques) ;
- la variabilité statistique des méthodes utilisées pour déterminer les CMI et les diamètres des zones d'inhibition.

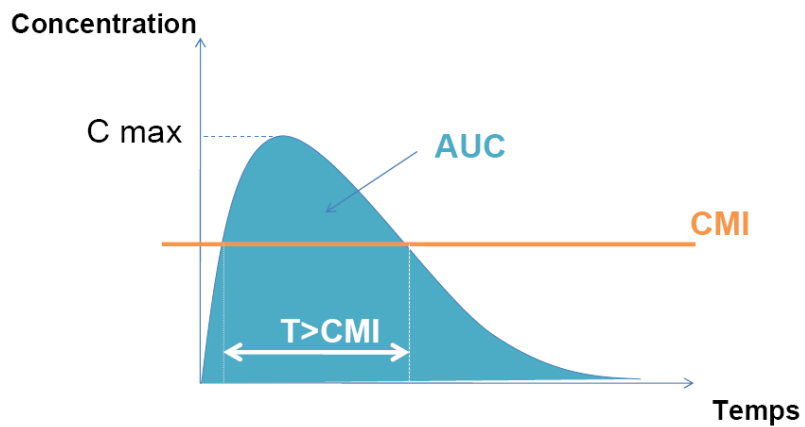


Figure 2 : Paramètres pharmacodynamiques influençant l'action des antibiotiques.

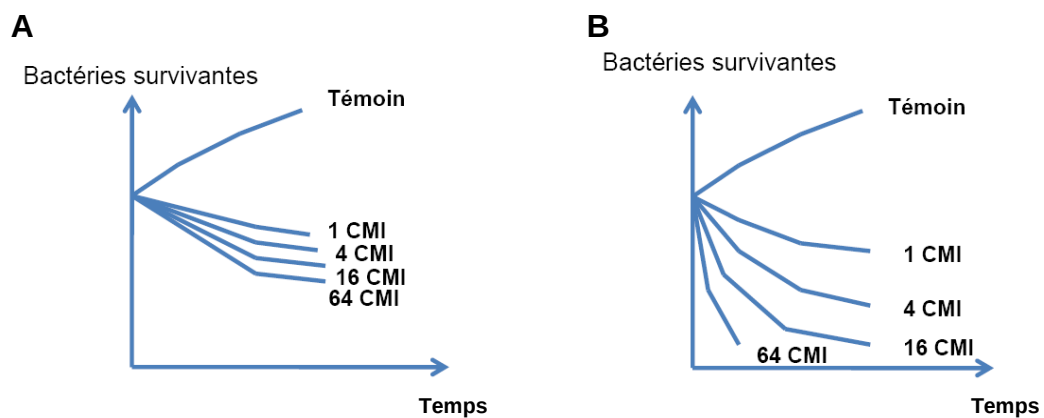


Figure 3 : Evolution de l'effet antibactérien, en fonction de la concentration en antibiotique et du temps. (A) : antibiotique temps-dépendant (β -lactamines) ; (B) antibiotique concentration-dépendant (aminosides).

1.1.3. Type d'activité : temps ou concentration dépendante, effet post-antibiotique, effet inoculum

Quatre notions sont importantes à retenir afin de qualifier l'activité des antibiotiques (Figure 2) [Van Bambeke et al., 1999 ; Calop et al., 2008] :

› **activité dite « temps-dépendante »** : l'activité est fonction de la durée d'exposition des bactéries à l'antibiotique. L'indice pharmacologique à surveiller est $T > CMI$: temps pendant lequel la concentration est supérieure à la CMI (Figure 3A). Pour les antibiotiques temps-dépendants, il est parfois intéressant de procéder à une administration continue, afin de s'assurer d'une concentration suffisante sur les 24 h. Cette notion s'applique aux pénicillines, céphalosporines, glycopeptides, fluoroquinolones et oxazolidinones (sur les staphylocoques).

› **activité dite « concentration-dépendante »** : l'activité est fonction de la concentration. L'indice pharmacologique à surveiller est le rapport C_{max}/CMI (Figure 3B). Ce qualificatif est utilisé pour les aminosides, l'imipénème, les fluoroquinolones (sur les bactéries à Gram -) et la daptomycine. Pour ces antibiotiques, l'activité est optimale lorsque les concentrations *in vivo* dépassent de 10 à 20 fois la CMI d'une bactérie donnée.

› **effet post-antibiotique** : pour un couple bactérie-antibiotique donné, correspond au délai de recroissance bactérienne après exposition à l'antibiotique.

› **effet inoculum** : influence de la quantité de bactéries au site de l'infection, en contact avec l'antibiotique.

Ces paramètres sont importants puisqu'ils influent sur le choix des doses, de la voie d'administration et des intervalles entre les prises.

1.1.4. Association d'antibiotiques : synergie, antagonisme, indifférence

L'utilisation combinée de deux ou plusieurs antibiotiques peut être indiquée :

- Pour prévenir ou retarder l'émergence de mutants résistants dans des situations bien particulières, comme par exemple lors du traitement de la tuberculose due à *Mycobacterium tuberculosis* (tri- voire quadrithérapie).

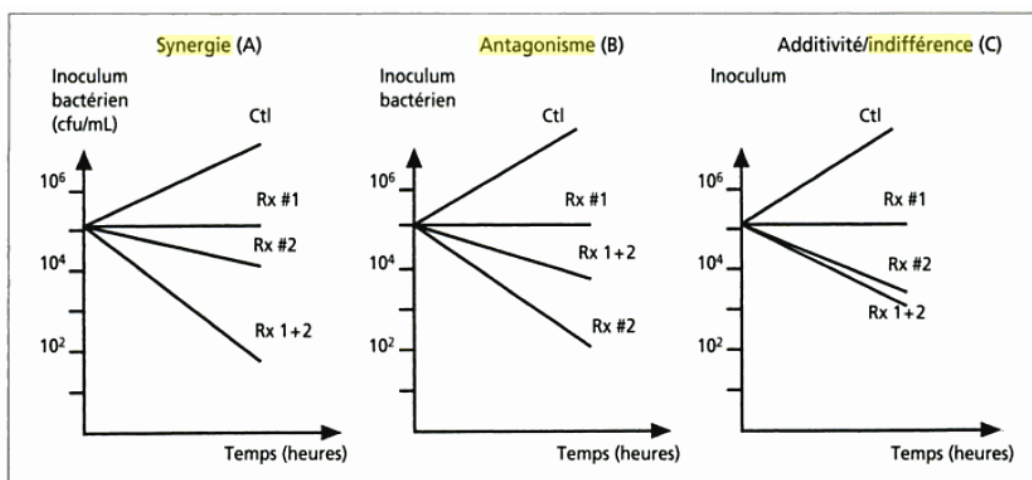


Figure 4 : Les associations d'antibiotiques. (A) Synergie ; (B) Antagonisme ; (C) Indifférence. Ctl : contrôle. Rx1# : antibiotique 1. Rx #2 : antibiotique 2.

- Lors d'antibiothérapie initiale, lorsque la gravité de la maladie (ex. : septicémie) et/ou l'état du patient (ex. : neutropénie) le justifie, et en attendant les résultats de l'antibiogramme.
- Lors de certaines infections poly-bactériennes, en particulier d'origine abdominale, où peuvent être présentes des bactéries aérobies et anaérobies.
- Pour obtenir des effets de synergie dans des situations difficiles à traiter (ex. : endocardites à *Streptococcus* spp.), ce qui permet aussi de diminuer le dosage d'un antibiotique potentiellement toxique.

L'utilisation combinée de deux antibiotiques peut se caractériser par une synergie, une indifférence (ou effet additif) ou un antagonisme (Figure 4) [Calop et al., 2008] :

- › **Synergie** : deux antibiotiques agissent en synergie si, lorsque utilisés en association, ils entraînent une diminution de l'inoculum bactérien de plus de deux logarithmes par rapport au meilleur des deux agents utilisé seul. La seule synergie prouvée *in vivo* actuellement, est celle de l'association β -lactamines-aminosides.
- › **Indifférence (ou addition)** : l'effet de la combinaison est égale à la somme des effets de chaque composant utilisé seul.
- › **Antagonisme** : l'antagonisme se produit lorsque l'association d'antibiotiques entraîne une activité antibactérienne moindre que le meilleur des deux antibiotiques.

Il existe différents systèmes pour déterminer *in vitro* l'effet d'une association d'antibiotiques. Cependant, à part quelques exceptions, il est difficile d'extrapoler les résultats obtenus *in vitro* à la situation clinique (*in vivo*). Par exemple, *in vivo*, les deux antibiotiques d'une association ne vont pas diffuser ou être éliminés de la même façon ou à la même vitesse, ce qui fait que les concentrations de l'un par rapport à l'autre peuvent varier fortement en fonction de la voie d'administration, du site de l'infection et du temps. Cela sera discuté plus loin.

1.2. Classification, mécanisme d'action, relations structure-activité

Les structures ne seront pas développées dans cette partie (à moins de détails particuliers qu'il est nécessaire de souligner). Les structures sont présentées dans le Tableau I (relations structure-activité).

1.2.1. Antibiotiques inhibant la biosynthèse de la paroi bactérienne

1.2.1.1. β -lactamines

Les β -lactamines restent la famille d'antibiotiques la plus utilisée, la plus diversifiée et la moins toxique. Les β -lactamines peuvent être classées selon plusieurs critères, nous retiendrons ici la structure chimique. Elle est construite autour du **noyau Azétidinone** (lactone amide cyclique = cycle β lactame) et on distingue 4 sous familles chimiques en fonction du cycle associé :

› Pénames :	cycle thiazolidine	Pénicillines
› Céphèmes :	cycle dihydrothiazine	Céphalosporines
› Pénèmes :	cycle thiazolidine Δ 2-3	Carbapénèmes
› Monobactames :	aucun cycle associé	Aztréonam

☉ **Mécanisme d'action** (Figure 5)

Bactéricides (sauf vis-à-vis des entérocoques pour lesquels l'effet est le plus souvent bactériostatique, on parle de phénomène de tolérance).

Leur mécanisme d'action est présenté Figure 5 [Jehl et al., 2004] :

1) Pénétration jusqu'à la membrane cytoplasmique

Chez les bactéries à Gram +, la pénétration est généralement aisée car le peptidoglycane n'est pas une barrière pour des molécules aussi petites que les β -lactamines.

Chez les bactéries à Gram -, la voie des porines est la voie privilégiée de passage des β -lactamines hydrophiles. L'aspect purement quantitatif de la vitesse de diffusion des β -lactamines à travers les porines est essentiel dans la compréhension de leur mode d'action chez les Entérobactéries. Dans la mesure où cette diffusion est passive, la concentration dans le périplasme doit pouvoir atteindre celle

régnant à l'extérieur de la bactérie, indépendamment de la vitesse de diffusion. Il existe cependant dans le périplasme des mécanismes tendant à faire diminuer la concentration des β -lactamines (β -lactamases, affinité des PLP, diffusion intracytoplasmique). La vitesse de pénétration des β -lactamines est conditionnée par leurs propriétés physico-chimiques : hydrophobicité, taille et charge. Le facteur clé du comportement d'une β -lactamine dans l'espace périplasmique est le rapport existant entre sa vitesse de pénétration et sa résistance aux β -lactamases périplasmiques, qui sont toujours présentes, ne serait-ce qu'à très bas niveau, même si elles ne sont pas décelables par les techniques traditionnelles. Parmi les β -lactamines de 1^{ère} génération (ampicilline, céphalosporines de 1^{ère} génération = C₁G), il existe une relation claire entre leur activité sur les bactéries à Gram - et leur vitesse de diffusion. En effet, leur vitesse de flux d'entrée est telle qu'il y aura toujours assez de molécules pour inhiber la PLP, même si une partie d'entre elles sont hydrolysées par d'éventuelles β -lactamases. Parmi les composés les plus récents, cette relation n'est plus aussi claire. La pipéracilline ou les C₃G ont des vitesses de diffusion relativement faibles mais sont très actives, ce qui peut s'expliquer par une bonne stabilité face aux β -lactamases.

2) Fixation aux protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou « penicillin-binding proteins » (PBP)

Ce sont des protéines localisées au niveau de la membrane cytoplasmique et qui ont une activité de carboxypeptidase, d'endopeptidase, de transpeptidase, ou de glycosyltransférase ; ces enzymes sont impliquées dans la phase terminale de l'assemblage du peptidoglycane. L'inactivation des PLP se fait par formation de complexes covalents avec les β -lactamines, par analogie de structure avec le dipeptide DAla-DAla.

3) Inhibition de la transpeptidation

Les β -lactamines se fixent au niveau du site actif sérine ; l'acyl-enzyme résultante a une vitesse d'hydrolyse extrêmement faible, ce qui réduit le taux de liaisons intermoléculaires formées au sein du peptidoglycane.

4) Conséquence de la fixation – Effet bactériostatique

Trois effets morphologiques différents ont été observés selon les fixations préférentielles d'une β -lactamine sur la PLP : formation de filaments (induction du système SOS ?), de sphéroplastes suivie d'une lyse bactérienne, ou formes globulaires. Ainsi, l'inhibition de la PLP2 entraîne l'apparition de formes rondes, et l'inhibition de la PLP3 aboutit à la formation de filaments. L'inhibition en soi des PLP entraîne un arrêt de croissance, ce qui correspond à un effet bactériostatique.

5) Lyse bactérienne – Effet bactéricide

L'effet bactéricide des β -lactamines repose sur la mise en jeu des enzymes des systèmes lytiques. Ces lysines regroupent des glycosidases (rompant les chaînes glycaniques), des amidases (coupant les liaisons amides) et des peptidases. A l'heure actuelle, le mécanisme précis qui, suite à l'inhibition des PLP, déclenche une activité accrue de ces enzymes reste inconnu. Les mécanismes de la lyse bactérienne ont cependant été bien étudiés chez *E. coli* et *S. pneumoniae*.

Voyons plus en détail le mécanisme chez *S. pneumoniae*. La lyse survient rapidement sous l'action de la pénicilline G. La N-acétyl-muramyl-L-alanine amidase, encore appelée muréine hydrolase, pourrait intervenir de deux manières au cours de la lyse bactérienne [Jehl et al., 2004] :

- **Lyse par rupture de l'équilibre entre les activités hydrolyse/synthèse de la paroi.** A l'état normal, au cours de la synthèse du peptidoglycane, l'hydrolyse permet une rupture du filament de muréine autorisant l'accrochage de nouvelles unités pariétales. L'inhibition des réactions de synthèse, sans inhibition parallèle des hydrolases, donnerait une rupture pariétale et la lyse de la cellule.
- **Lyse par libération d'une autolysine active uniquement au cours de la division bactérienne.** Cette autolysine serait normalement inhibée dans la cellule par l'acide lipoteichoïque lié à la partie externe du peptidoglycane.

La pénicilline, en inhibant la synthèse du peptidoglycane, modifierait les équilibres moléculaires normaux, ce qui aurait pour conséquence la libération de la muréine hydrolase de son inhibiteur et la mise à jour des sites constituant les substrats pour cette enzyme. Il en résulte l'hydrolyse du peptidoglycane pariétal.

En dehors des carbapénèmes, l'activité des β -lactamines est de type **temps-dépendant**, avec un effet post-antibiotique faible ou nul, et un **effet inoculum marqué**. Leur association avec les aminosides est synergique aussi bien vis-à-vis des bacilles à Gram - que des cocci à Gram +.

* Les pénicillines

La **pénicilline G** (ou *benzylpénicilline*), redécouverte par Alexander Fleming en 1929, chez *Penicillium notatum* fut plus tard extraite de cultures de *Penicillium chrysogenum*, plus productif. La **pénicilline V** (ou *phénoxyéthylpénicilline*), résistante à l'acide gastrique, fut isolée en 1953. À partir de 1957, date

à laquelle a été isolé l'**acide 6-aminopénicillanique**, de nombreuses pénicillines de synthèse ont vu le jour, par substitution du noyau pénicillanique. L'activité de ces 1^{ères} pénicillines est essentiellement centrée sur les cocci à Gram +. Les améliorations successives ont conduit à un élargissement du spectre d'activité et à une association progressive à des inhibiteurs de β -lactamases afin de limiter les résistances déjà apparues et identifiées. Les pénicillines M (mécicilline, oxacilline), présentent comme particularité, une activité conservée sur les souches de staphylocoques productrices de pénicillinases. Les pénicillines A (amoxicilline) se caractérisent par une activité étendue à certaines Entérobactéries non porteuses de pénicillinase. Le spectre s'étend ensuite à toutes les Entérobactéries, et aux bacilles à Gram – non fermentants comme *P. aeruginosa*, avec la classe des carboxypénicillines (ticarcilline) et des uréidopénicillines (pipéracilline) ; qui sont les molécules possédant le spectre le plus large.

* Les céphalosporines

Parmi les différentes classes de β -lactamines, les céphalosporines ont eu l'évolution la plus spectaculaire : il existe actuellement plus de 50 produits commercialisés, destinés à la voie orale ou parentérale. Les céphalosporines ont pour structure commune l'**acide 7-amino céphalosporanique**. La classification la plus fréquente est celle des différentes générations, chaque génération correspondant à un certain pouvoir intrinsèque et spectre antibactérien, ainsi qu'à une capacité de résistance à l'hydrolyse des β -lactamases. L'activité antibactérienne *in vitro* sur les bactéries à Gram + va en décroissant et sur les bactéries à Gram - en augmentant des 1^{ères} aux dernières générations. Aucune activité n'est retrouvée sur les *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. du groupe D, *Listeria* spp., *Legionella* spp., *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp.

Mais la recherche ne s'est pas arrêtée là, et de nouvelles molécules sont actuellement en développement, afin de pallier à l'émergence de bactéries multi-résistantes. Un des meilleurs candidats est le ceftobiprole, actuellement en essai de phase III. Cette nouvelle céphalosporine de « 4^{ème} génération » a prouvé son efficacité sur les Pneumocoques de Sensibilité Diminuée à la Pénicilline (PSDP), sur les *Staphylococcus aureus* Résistants à la Mécicilline (SARM) et à la Vancomycine (VRSA), sur les entérocoques et sur un certain nombre de bactéries à Gram – (activité identique au céfépime sur les Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* ; *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*) [Bogdanovich et al., 2006 ; Amsler et al., 2008].

* Les carbapénèmes

Cette classe est caractérisée par le noyau carbapénème, où l'atome de soufre du cycle thiazolidine a été remplacé par un atome de carbone. L'imipénème est un dérivé de la thiénamycine, antibiotique produit par *Streptomyces cattleya*. Trois molécules sont commercialisées actuellement : imipénème en association avec la cilastatine (TIENAM®), ertapénème (INVANZ®), méropénème (MERONEM®). La cilastatine est un inhibiteur de la déhydropeptidase, enzyme responsable de la dégradation de l'imipénème, au niveau de la bordure en brosse du tubule proximal rénal ; cette association permet une élimination urinaire de l'imipénème sous forme active.

☺ Leur **activité n'est pas influencée par l'effet inoculum**, contrairement aux autres β -lactamines. Il existe un **effet post-antibiotique** sur les bactéries à Gram -.

De même que pour les céphalosporines, la recherche sur les carbapénèmes est actuellement en plein essor. Des essais ont ainsi été menés, fin des années 90, sur des dérivés tétrahydrofuranyl substitués par un groupement aminométhyl ; ces molécules présentaient un effet bactéricide rapide, et un effet post-antibiotique prolongé [Weiss et al., 1999]. Actuellement, le candidat le plus avancé est le doripénème : il garde son activité sur des souches devenues résistantes à l'imipénème ou au méropénème, et serait moins apte à induire des résistances [Bassetti et al., 2009 ; Shafer et al., 2009].

☉ Les monobactames : Aztréonam (AZACTAM®)

Les monobactames (pour « MONOCyclic BACTERially produced beta-lacTAMS ») sont des antibiotiques isolés d'une bactérie, *Chromobacterium violaceum*, et dont une série de substitutions latérales ont renforcé l'efficacité. L'aztréonam ne possède que le cycle azétidine. C'est un antibiotique à la fois résistant aux β -lactamases et un inactivateur de céphalosporinases.

1.2.1.2. Glycopeptides

Le premier glycopeptide isolé, la vancomycine, l'a été en 1956 à partir d'échantillons de sols prélevés en Inde et en Indonésie, contenant *Streptomyces orientalis* (aujourd'hui *Nocardia orientalis*). Les glycopeptides sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique sur lequel

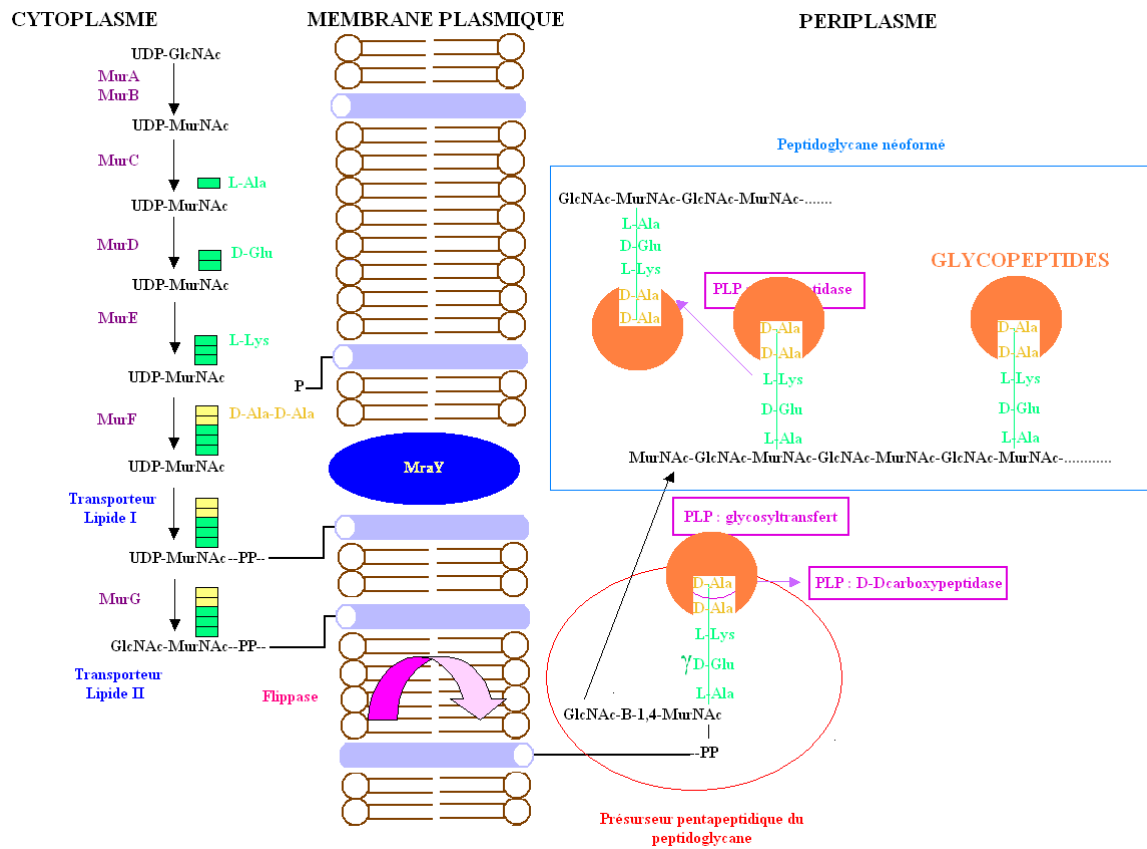


Figure 6 : Cible d'action des glycopeptides.

viennent se greffer des sucres : glucose et vancosamine dans le cas de la vancomycine, mannose et glucosamine dans le cas de la teicoplanine (extraite de *Actinoplanes teicomycetus*).

Deux spécialités sont commercialisées à l'heure actuelle :

- **Vancomycine** (VANCOCINE®)
- **Teicoplanine** (TARGOCID®) : cette molécule est moins utilisée du fait de son coût plus important, et de son activité moindre sur certaines espèces de staphylocoques à coagulase négative (SCN) (à noter qu'elle n'est pas commercialisée aux Etats Unis).

☉ Mécanisme d'action (Figure 6)

Bactéricides.

Les glycopeptides sont, au même titre que les β -lactamines, des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane, mais dans sa phase finale, au stade pariétal. La poche vient recouvrir le dipeptide DAla-DAla situé à l'extrémité des précurseurs pentapeptidiques du peptidoglycane, théoriquement prêts à être incorporés dans le peptidoglycane en cours d'élongation. Par encombrement stérique, les glycopeptides vont ainsi empêcher l'action des glycosyltransférases et des transpeptidases, bloquant ainsi l'élongation du peptidoglycane [Van Bambeke et al., 2004]. Les glycopeptides sont lentement bactéricides (24-48 h) mais les mécanismes à l'origine de la bactéricidie sont inconnus à l'heure actuelle. Les glycopeptides sont inactifs sur les bacilles à Gram - (leur taille les empêchant de pénétrer par la voie des porines), les anaérobies à Gram -, et les bactéries à multiplication intracellulaire.

Des avancées significatives ont été réalisées dans le domaine des antibiotiques glycopeptidiques, en particulier ces 20 dernières années. Cela est très important si l'on considère le challenge posé par l'apparition et la dissémination de la résistance aux glycopeptides. Les travaux menés sur d'éventuels dérivés semi-synthétiques à partir de la vancomycine et de la teicoplanine ont révélé trois bons candidats potentiels : oritavancine, dalbavancine et télavancine.

☐ Oritavancine

L'oritavancine (LY 333328), dérivé de la vancomycine, a été le 1^{er} candidat de cette nouvelle famille, (structure chimique présentée Figure 7). Le spectre antibactérien est centré sur les cocci à Gram +, avec une activité étendue aux entérocoques porteurs des gènes *vanA*, aux VRSA, aux

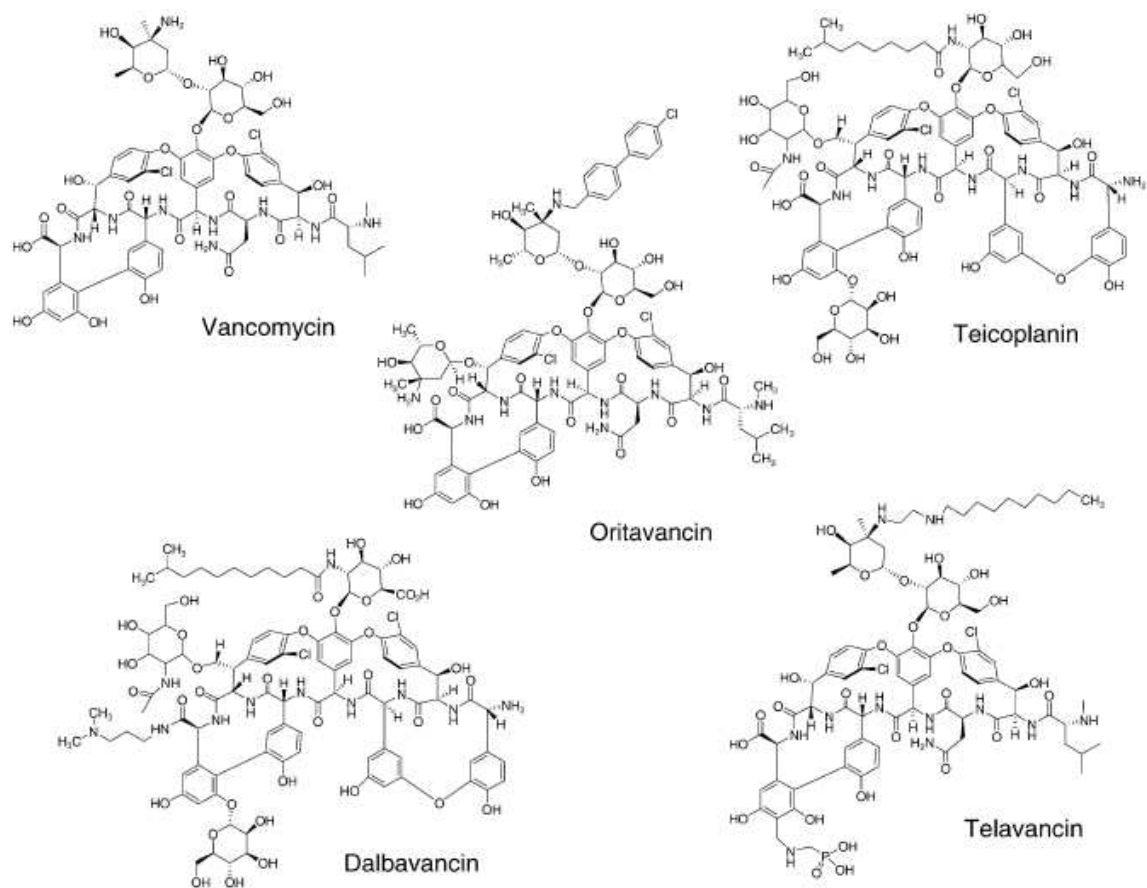


Figure 7 : Structure des glycopeptides, et des nouveaux lipoglycopeptides (d'après [Pace & Yang, 2006]).

staphylocoques et à *S. pneumoniae*. Alors que les glycopeptides ont une activité bactériostatique sur les entérocoques, l'oritavancine est bactéricide, avec une demi-vie prolongée (18 h) [Pace & Yang, 2006].

▣ Dalbavancine

Ce dérivé de la teicoplanine est le plus avancé en terme d'études cliniques. Le squelette de la teicoplanine a été modifié par ajout d'un groupement amide au niveau C terminal et par modification du groupement acylglucosamine hydrophobe (Figure 7). Son spectre d'activité est plus restreint que celui de l'oritavancine, avec par exemple une absence d'activité sur les ERG *vanA*, mais améliore l'activité sur les SCN et *S. pneumoniae*, par comparaison à la teicoplanine [Pace & Yang, 2006].

▣ Telavancine

Les objectifs de la recherche sur la telavancine étaient (i) d'augmenter l'activité bactéricide de la vancomycine, (ii) restaurer l'activité sur les souches porteuses de gènes *van*, et (iii) améliorer les paramètres pharmacocinétiques/pharmacodynamiques en autorisant une administration par jour. Pour cela, un groupement decyl-aminopropyl a été ajouté au niveau du dérivé vancosamine, et un substituant hydrophile méthylamino-phosphonate a été introduit en position résorcinol (Figure 7). La solubilité a été améliorée et la formulation facilitée par utilisation de hydroxyl-propyl- β -D-cyclodextrine comme excipient dans les préparations parentérales [Pace & Yang, 2006]. La telavancine a une activité bactéricide, temps- et concentration dépendante (y compris sur les ERG *vanA* et les VRSA), avec un effet post-antibiotique prolongé [Barcia-Macay et al., 2006].

1.2.1.3. Fosfomycine (VO : MONURIL[®], IV : FOSFOCINE[®])

La fosfomycine est un antibiotique découvert en 1969, sous le nom de phosphonomycine, produit par des *Streptomyces* mais aussi par *Pseudomonas syringae* [Hendlin et al., 1969]. La fosfomycine appartient à la famille des acides phosphoniques. Cet antibiotique mis sur le marché en 1980 s'administre par voie orale (présentation « monodose ») et par voie parentérale, mais dans ce cas, toujours en association avec un autre antibiotique afin d'éviter la sélection de mutants résistants.

◎ Mécanisme d'action

Bactéricide.

Chez les bactéries à Gram -, la fosfomycine franchit la membrane externe par la voie des porines ; la traversée du peptidoglycane chez les bactéries à Gram + se fait aisément en raison de la petite taille de la molécule [Jehl et al., 2004]. Elle pénètre ensuite dans le cytoplasme par deux systèmes de transport actif :

- **glp T** : système de transport du glycérophosphate, prépondérant, d'expression constitutive ;
- **uhp T** : système de transport des hexoses monophosphates, secondaire, d'expression inductible. Ce caractère inductible impose la présence de glucose-6-phosphate dans le milieu utilisé pour tester la sensibilité des bactéries à la fosfomycine [El Zoeiby et al., 2003].

La fosfomycine agit au début de la synthèse du peptidoglycane, dans la phase cytoplasmique. Elle se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe la pyruvate-UDP-N-acétylglucosamine-transférase (MurA), ce qui a pour conséquence de bloquer la formation d'acide N-acétylmuraminique, l'un des constituants essentiels du peptidoglycane [Jehl et al., 2004]. Le mécanisme d'action de cet antibiotique a beaucoup été étudié. L'inhibition de MurA par la fosfomycine est compétitive pour le GlcNAc et dépendante du temps. Dans un premier temps, le GlcNAc doit se lier à MurA pour permettre par la suite la liaison de la fosfomycine et l'inhibition de l'enzyme. L'antibiotique joue le rôle d'un analogue de phosphoénolpyruvate et forme un lien covalent avec le résidu actif cystéine en position 115 de MurA [El Zoeiby et al., 2003].

Le mécanisme d'action spécifique de la fosfomycine se traduit par une synergie d'action quasi-constante avec les autres antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne.

1.2.2. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique

1.2.2.1. Polymyxines, colistine (COLIMYCINE®)

Les polymyxines A, B, C, D, E, F, K, M, P, S et T sont des antibiotiques peptidiques cycliques qui ont été isolées de *Bacillus polyxema*, à partir de 1947 pour le polymyxine B, et de 1949 pour la polymyxine E (*Bacillus polymyxa subsp. colistinus*) [Kwa et al., 2008]. Ces antibiotiques très utilisés dans les années 60, ont rapidement été remplacés dans les années 70 par d'autres antibiotiques



Figure 8 : Structure chimique (A) de la polymyxine B, (B) de la colistine.

moins toxiques et ont été longtemps oubliés. De nos jours, seules la polymyxine B et la polymyxine E (ou colistine) sont utilisées en thérapeutique, essentiellement en topique, du fait de leur faible absorption digestive. Lorsqu'il n'existait aucun autre antibiotique actif sur les bactéries à Gram-, ces molécules ont rendu d'appréciables services ; actuellement, elles connaissent un regain d'intérêt avec l'apparition de bactéries multirésistantes, en particulier *P. aeruginosa* pour laquelle la colistine reste parfois le seul antibiotique actif [Falagas et al., 2008 ; Landman et al., 2008].

Les polymyxines sont des molécules amphipathiques, possédant une partie lipidique hydrophobe, et une partie peptidique polaire, possédant 5 groupements aminés non masqués [Kwa et al., 2008]. La seule différence entre les polymyxines B et E réside en l'enchaînement des acides aminés. Ces molécules sont constituées d'un enchaînement de L- et D-amino acides organisés sous forme d'un cycle heptapeptidique, avec un chaîne tripeptidique liée de façon covalente via un groupement acyl à la chaîne lipidique. La colistine contient de la D-Leucine, remplacée pour la polymyxine B par de la D-Phénylalanine (Figure 8) [Kwa et al., 2008].

☉ Mécanisme d'action

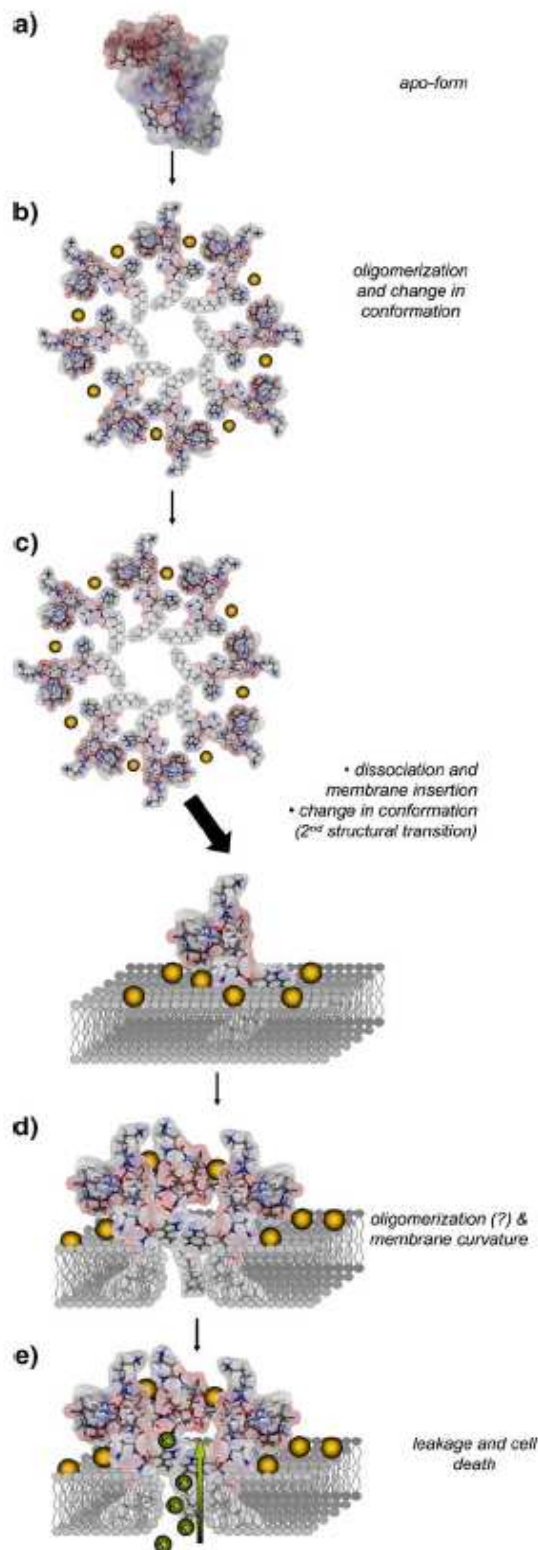
Bactéricides.

Les polymyxines agissent comme des détergents cationiques : grâce à leur caractère amphipathique, elles pénètrent dans la bactérie et s'insèrent parmi les phospholipides de la membrane cytoplasmique, perturbant ainsi la perméabilité membranaire. Cela conduit à un relargage du contenu intracytoplasmique et à la mort de la bactérie. Ce mécanisme implique initialement des interactions de type électrostatiques entre les polymyxines polycationiques et le LPS anionique de la membrane externe des bactéries à Gram -, puis une perturbation de l'organisation de la membrane par déplacement des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} (responsables de la stabilité du LPS) [Kwa et al., 2008].

1.2.2.2. Daptomycine (CUBICIN®)

La daptomycine est un bel exemple de molécule réévaluée, du fait du besoin urgent de nouveaux antibiotiques, face à la dissémination des BMR. Elle a été découverte en 1986, 1^{er} membre d'une nouvelle famille de composés lipopeptidiques [Eliopoulos et al., 1986]. Son développement a été rapidement arrêté en 1993, du fait de sa mauvaise efficacité avec un schéma de deux administrations

Figure 9 : Proposition de mécanisme d'action de la daptomycine, d'après [Straus & Hancock, 2006].



a) en l'absence de Ca^{2+} , la daptomycine adopte une structure non amphiphile.

b) en présence de Ca^{2+} dans un ratio 1:1 avec la daptomycine, le lipopeptide s'oligomérisse, et forme un micelle contenant 14 à 16 unités. Ce processus est accompagné d'un changement de conformation.

c) une fois que la daptomycine s'approche de la membrane bactérienne, le multimère se dissocie, et la daptomycine s'insère dans la double couche phospholipidique. Cela s'accompagne d'une 2^{ème} transition structurale (dont le mécanisme est inconnu).

d) L'insertion de la daptomycine dans la membrane induit une courbure positive, et l'oligomérisation de la molécule.

e) Des pores se forment dans la membrane, qui se dépolarise, le contenu cellulaire est relargué, ce qui conduit à la mort de la bactérie.

par jour, et de sa toxicité importante. La molécule a été reprise par Cubist Pharmaceuticals en 1997, et des modifications ont été apportées afin d'améliorer la pharmacodynamie [Oleson et al., 2000 ; Cha et al., 2003]. La demande d'enregistrement a été effectuée en 2003 auprès de la FDA, et en 2006 en Europe. La molécule est aujourd'hui commercialisée sous le nom de CUBICIN[®] avec comme indications essentielles, les infections compliquées de la peau et des tissus mous.

Les lipopeptides sont une famille de composés peptidiques, linéaires ou cycliques, porteurs d'une charge globale positive ou négative, et auxquels est fixée une partie lipidique en N-terminal. La daptomycine est un lipopeptide cyclique polyanionique. Son activité est limitée aux bactéries à Gram + du fait d'un défaut de pénétration à travers la membrane externe des bactéries à Gram – (molécule volumineuse et chargée négativement).

● Mécanisme d'action (Figure 9)

Bactéricide.

De nombreuses équipes se sont penchées sur le mécanisme d'action de la daptomycine, et le consensus général qui ressort est le suivant : la daptomycine possède une activité bactéricide rapide, par liaison à la membrane cytoplasmique, mécanisme Ca^{2+} dépendant : oligomérisation dans la membrane conduisant à un efflux de potassium. Cela conduit à la mort de la bactérie par dysfonctionnement des voies de synthèse macromoléculaires [Silverman et al., 2003].

La daptomycine requiert de façon absolue la présence de Ca^{2+} pour son activité : cela est indispensable aux changements de conformation structurale. De plus, les interactions de la daptomycine avec les membranes lipidiques dépendent de la présence de lipides négativement chargés ; le relargage du contenu cellulaire et la fusion des liposomes ne sont induits qu'en présence de phosphatidylcholine et de phosphatidylglycérol [Straus & Hancock, 2006]. Un nouveau modèle de mode d'action a été proposé par Straus & Hancock, et est présenté Figure 9.

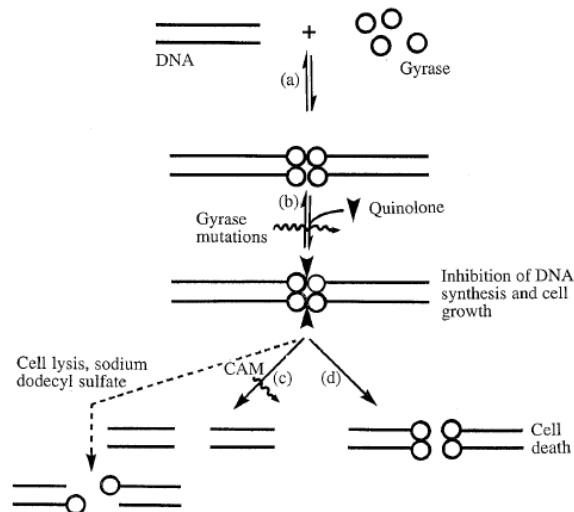


Figure 10 : Mécanisme d'action des quinolones, d'après [Drlica & Zhao, 1997].

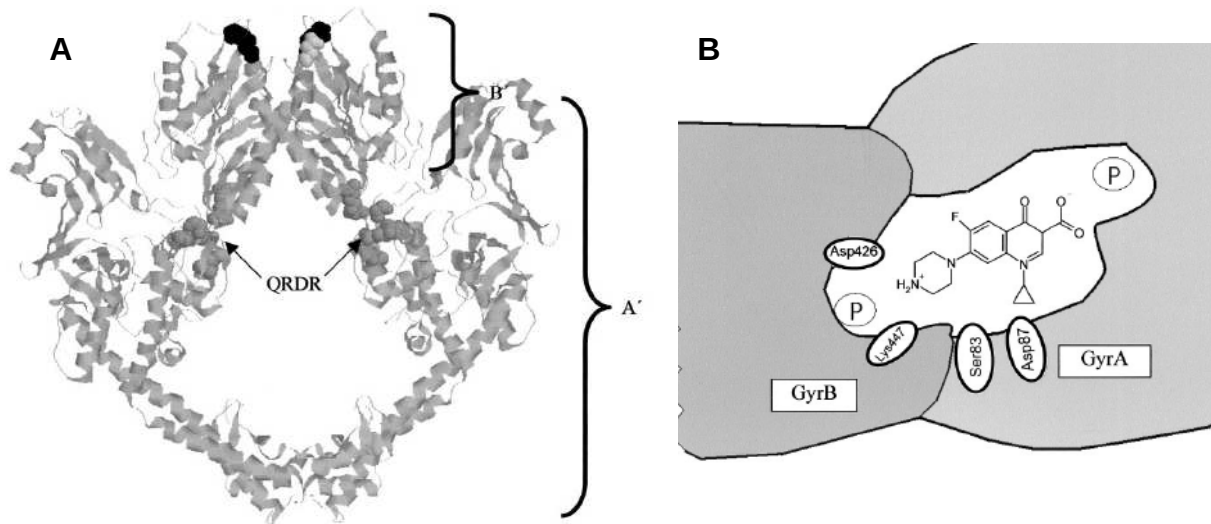


Figure 11 : Interaction ADN-gyrase-fluoroquinolones. (A) : situation du site QRDR au niveau de la gyrase (sous-unités GyrA et GyrB) ; (B) : représentation du site de liaison des quinolones. D'après [Hedde & Maxwell, 2002].

1.2.3. Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques

1.2.3.1. Quinolones et Fluoroquinolones

Les quinolones sont des antibiotiques de synthèse. En 1958, l'activité bactéricide d'un produit secondaire obtenu lors de la synthèse de la chloroquine (connue, elle, depuis 1939) : **la 7-chloroquinoline**, a été découverte. En 1962, la première quinolone directement dérivée de la 7-chloroquinoline vit le jour : **l'acide nalidixique**, indiqué pour le traitement des infections du tractus urinaire par certains bacilles à Gram -. L'acide nalidixique présente une substitution de l'atome de carbone en position 8 dans le noyau quinoléine par un atome d'azote, ce qui donne un **noyau naphthyridine**. Rapidement, d'autres dérivés furent synthétisés à partir du noyau naphthyridine de l'acide nalidixique. Ainsi, une substitution en position 7 par la piperazine aboutit à des composés, tel l'acide pipémidique (Pipram[®]), montrant une demi-vie augmentée, et actifs notamment contre *P. aeruginosa*. Ce n'est cependant que dans les années 80 que virent le jour les **fluoroquinolones**, après incorporation d'un **atome de fluor en position 6** et un retour au noyau de type quinoléine. Ces composés ont montré une activité accrue sur les bactéries à Gram +. Les fluoroquinolones se sont diversifiées tout en conservant une structure de base : l'acide quinoléine-3-carboxylique substitué par un groupement pipérazinyl en 7 et un atome de fluor en 6.

◎ **Mécanisme d'action** (Figures 10 & 11)

Bactéricides.

Les quinolones doivent gagner le cytoplasme des bactéries pour exercer leur action. Chez les bactéries à Gram -, les quinolones, petites molécules hydrophiles, empruntent la **voie des porines** (OmpF par exemple). Les molécules possédant un certain degré d'hydrophobicité peuvent passer par la **voie du LPS après chélation d'ions Mg^{2+}** . La traversée du peptidoglycane se fait sans aucun problème ; la pénétration à l'intérieur du cytoplasme se fait par diffusion passive, non saturable. Il existe un processus naturel d'excrétion des quinolones par des systèmes d'efflux fonctionnant à bas niveau : la quantité disponible active sur la bactérie est la résultante de ces deux phénomènes [Jehl et al., 2004].

Les quinolones entraînent une inhibition rapide de la synthèse de l'ADN aboutissant à la mort bactérienne. Leurs cibles intracytoplasmiques sont les **topoisomérases de type II** : topoisomérase II

(ADN-gyrase) et topoisomérase IV, enzymes impliquées dans la régulation du surenroulement de l'hélice d'ADN sur elle-même [Drlica & Zhao, 1997 ; Hopper, 1999]. Ces enzymes sont essentielles au compactage de l'ADN, et au bon déroulement de la réplication et de la transcription. Elles sont constituées de deux sous-unités : GyrA et GyrB pour l'ADN gyrase, ParC et ParE pour la topoisomérase IV [Morissey et al., 1996 ; Heddle & Maxwell, 2002].

L'ADN gyrase a pour mission de créer une coupure dans le double brin d'ADN afin d'initier la réplication. Cette coupure, normalement transitoire, est suivie d'une réunion des deux brins. Lors de la réalisation de cette coupure, ADN et gyrase sont liés de façon covalente. La quinolone va venir former un complexe ternaire irréversible quinolone-ADN-gyrase (Figure 10). Les quinolones interagissent au niveau des **régions QRDR A et QRDR B** (au niveau du TOPRIM) (QRDR : « Quinolone Resistance-Determining Region »). L'ADN se lie au niveau de la tyrosine 122 de GyrA ou ParC ; les quinolones se fixent au niveau des paires de bases libres, bloquant ainsi le système en empêchant la ligation après coupure (Figure 11) [Morissey et al., 1996 ; Heddle & Maxwell, 2002 ; Madurga et al., 2008]. La transcription et la réplication de l'ADN sont inhibées. L'inhibition de la topoisomérase IV relève du même principe. Cependant, l'inhibition de ces deux enzymes n'explique que l'effet bactériostatique des quinolones. L'effet bactéricide est consécutif à la présence non réparable de la coupure du double brin d'ADN qui est à l'origine de phénomènes secondaires encore mal connus, liés à l'activation d'un système SOS [Cirz et al., 2007a].

Ces molécules sont caractérisées par un **effet post-antibiotique** : persistance de l'effet après arrêt du traitement, et leur activité est peu influencée par l'**effet inoculum**.

1.2.3.2. Rifamycines

Les rifamycines sont des composés appartenant aux ansamycines de type naphtalène et ont été isolées à partir de 1957 de la bactérie *Nocardia mediterranei*. Parmi les composés isolés, la rifamycine B s'avéra active envers les bactéries à Gram + ainsi que sur *Mycobacterium tuberculosis* et sur quelques bactéries à Gram -. La **rifampicine** (ou N-amino-N'-méthylpipérazine-hydrazone), qui est un composé semi-synthétique issu de la rifamycine B, montra l'activité la plus importante, ainsi que la plus faible toxicité. Il est aujourd'hui l'un des médicaments de choix des infections à Mycobactéries. La **rifabutine**, 2^{ème} composé commercialisé de cette classe, présente une meilleure activité sur les Mycobactéries atypiques. De nombreux autres dérivés sont actuellement à l'étude, d'une part pour

tenter de combattre des Mycobactéries devenues multirésistantes, d'autre part pour lutter contre des souches de Mycobactéries atypiques devenues pathogènes chez les sujets immunodéprimés ; enfin, pour lutter contre d'autres bactéries, telles que les légionnelles ou les staphylocoques, sur lesquels la rifampicine est active mais qu'on hésite à utiliser pour ne pas perdre leur potentiel antituberculeux.

☉ Mécanisme d'action

Bactéricides.

La rifampicine bloque l'initiation de la transcription de l'ADN en se fixant sur la sous-unité B de l'ARN polymérase ADN dépendante bactérienne, enzyme responsable de la transcription, codée par le gène *rpoB* [Wehrli et al., 1968].

☉ **La rifampicine doit toujours être utilisée en association** du fait du risque important et rapide de sélection des mutants résistants à haut niveau.

1.2.4. Antibiotiques inhibant certaines voies métaboliques

1.2.4.1. Sulfamides et diaminopyridines

Les sulfamides (ou sulphonamides) sont des molécules de synthèse, bactériostatiques. Ils sont généralement combinés aux 2,4-diaminopyridines, autres molécules bactériostatiques, afin d'augmenter leur activité et réduire le risque d'émergence de souches résistantes. Il est à noter que l'association sulfamide-diaminopyridine est bactéricide. Les **sulfamides** sont des dérivés de l'acide para-aminobenzène sulfonique (ou acide para-aminobenzoïque, PABA). Les **2,4-diaminopyridines** sont, à l'origine, des composés antiparasitaires dont les substituants du cycle diaminopyridine ont été modifiés. Le triméthoprim est la 2,4-diaminopyridine la plus connue.

☉ Mécanisme d'action (Figure 12)

Bactéricides en association.

Les sulfamides et les diaminopyridines agissent par inhibition de la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, cofacteur de la synthèse ultérieure des bases puriques et pyrimidiques. Les sulfamides et les diaminopyridines agissent successivement au niveau cette synthèse :

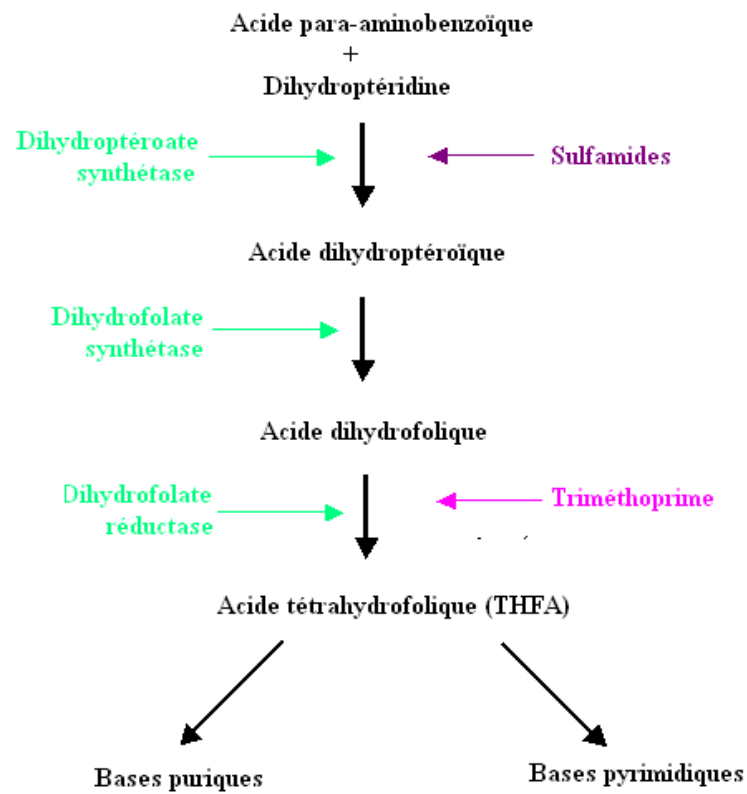


Figure 12 : Voie de synthèse de l'acide tétrahydrofolique et niveau d'action des sulfamides et des diaminopyridines.

- les **sulfamides**, en tant qu'analogues de l'acide para-aminobenzoïque par leur groupe sulfanilamide, bloquent la synthèse de l'acide dihydroptéroïque en inhibant de manière compétitive la dihydroptéroate synthétase.
- les **2,4-diaminopyridines**, en tant qu'analogues de l'acide dihydrofolique, inhibent spécifiquement la dihydrofolate réductase bactérienne.

La sélectivité d'action des sulfamides provient du fait que les bactéries doivent synthétiser leur acide folique par cette voie métabolique, alors que les eucaryotes assimilent directement l'acide folique apporté par l'alimentation.

Deux nouvelles diaminopyridines ont vu le jour ces dernières années : l'iclaprim et l'épiroprim. Ces molécules présentent un spectre d'activité intéressant sur SARM, VISA, VRSA, et sur les souches résistantes aux quinolones, macrolides et triméthoprim, ainsi que sur certaines bactéries à Gram – [Kohlhoff & Sharma, 2007]. Des essais de phase II et de phase III sont actuellement en cours en vue d'application dans les infections respiratoires et les infections de la peau et des tissus mous, respectivement.

1.2.4.2. Nitro-5-imidazolés : Métronidazole (FLAGYL®)

Autrefois classés dans les antiseptiques intestinaux du fait de leur activité sur *Giardia*, *Entamoeba* et *Trichomonas*, il a été ultérieurement constaté que ces dérivés pouvaient être utilisés de façon très efficace dans le traitement d'infections à bactéries anaérobies (*Bacteroides fragilis* par exemple). Le chef de file de ce groupe est le métronidazole, FLAGYL®, mais d'autres composés sont commercialisés, pour les propriétés amoebicides et trichomonacides : ornidazole (TIBERAL®), secnidazole (FLAGENTYL®), tinidazole (FASIGYNE®).

☉ Mécanisme d'action

Bactéricides.

Les nitro-5-imidazolés sont réduits ($\text{NO}_2 \rightarrow \text{NH}_2$) par les transporteurs d'électrons intra-cytoplasmiques des bactéries. Ce sont les dérivés intermédiaires de réduction qui sont actifs. Ceci explique que seules les anaérobies et les micro-aérophiles (*Helicobacter* spp., *Gardnerella* spp.) soient sensibles

aux nitro-imidazolés. Ils entraînent la fragmentation de l'ADN, par un mécanisme encore mal connu (formation de radicaux libres ?).

1.2.4.3. Nitrofurantoïne

Les nitrofuranes ont en commun un noyau furane substitué en position 5 par une fonction NO₂ indispensable à l'activité antibiotique. Les nitrofuranes acquièrent leur activité antibactérienne après la réduction enzymatique de leur fonction NO₂, catalysée par des réductases bactériennes, ce qui assure leur spécificité d'action.

☉ Mécanisme d'action

Bactériostatiques.

Après activation, les nitrofuranes inhibent des enzymes impliquées dans la dégradation du glucose et du pyruvate. Certaines de leurs formes réduites possèdent un pouvoir alkylant et pourraient causer des dommages à l'ADN et aux protéines. Les nitrofuranes présentent une activité statique aux concentrations thérapeutiques (leur CMB est 2 à 4 fois supérieure à leur CMI, mais ces concentrations ne peuvent pas être atteintes *in vivo*).

Les nitrofuranes présentent un antagonisme avec les fluoroquinolones et une synergie avec les tétracyclines vis-à-vis des cocci à Gram +. Ils ne présentent une concentration thérapeutique que dans le rein et l'urine, ce qui limite leur usage aux infections localisées à ces niveaux.

1.2.5. Antibiotiques actifs sur la synthèse des protéines

1.2.5.1. Macrolides – Lincosamides – Synergistines – Kétolides

L'usage a consacré le regroupement de ces familles d'antibiotiques, très différentes sur le plan de la structure chimique, en raison d'une similitude de spectres antibactériens et de mécanismes d'action.

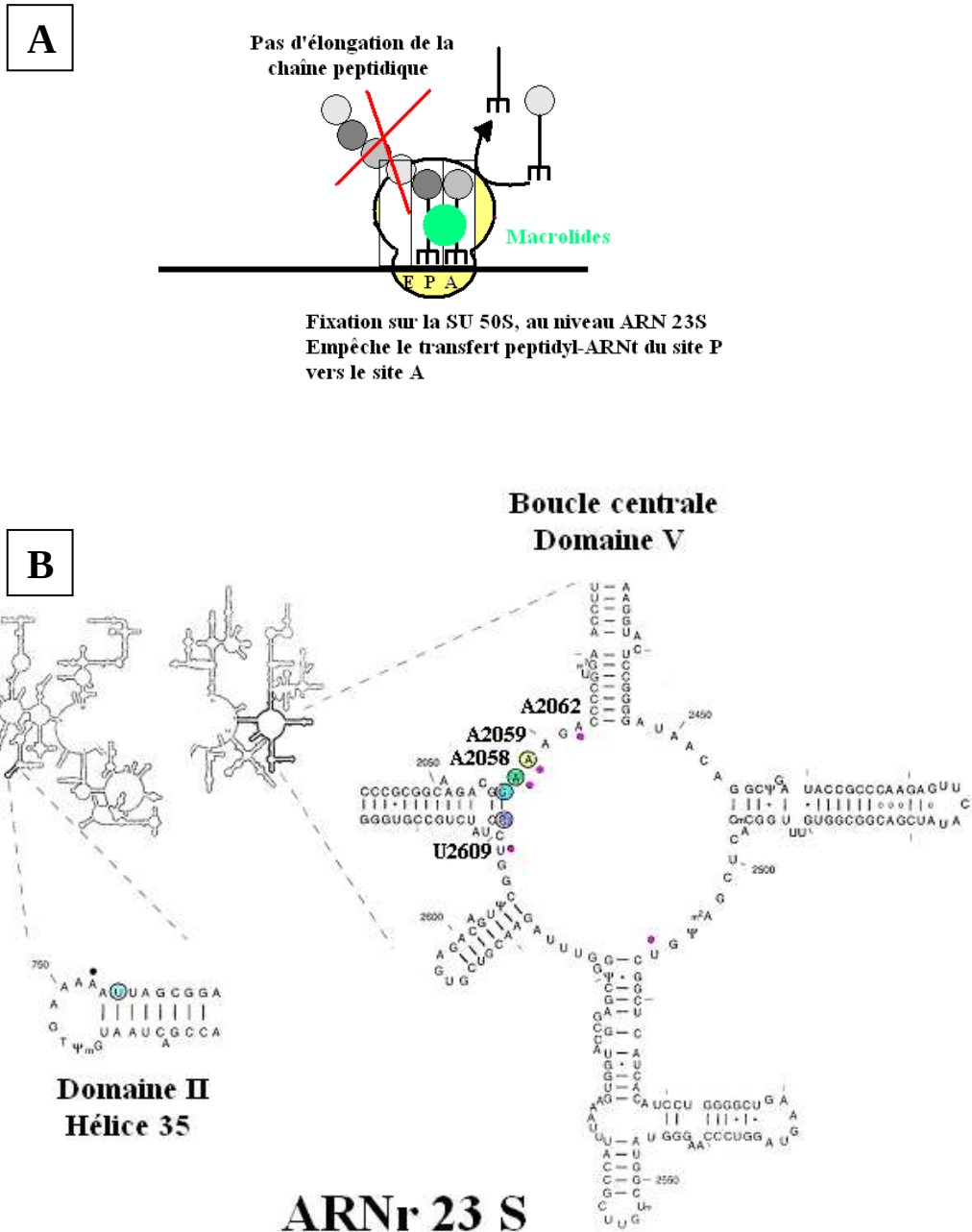


Figure 13 : Mécanisme d'action des MLSK. A : Schéma général ; B : Positions au niveau de l'ARN 23S d'*E. coli*, impliquées dans l'interaction avec les MLS et la téli-thromycine. D'après [Garza-Ramos et al., 2001].

◎ Mécanisme d'action (Figures 13 et 14)

Bactériostatiques.

Les macrolides se fixent sur l'**ARN 23S** de la **sous-unité 50S** des ribosomes bactériens. La liaison se fait au niveau du domaine V, (complexe peptidyltransférase (CPT)). Les liaisons sont de type hydrophobe, hydrogène, Van der Waals et ionique, sur trois sites préférentiels : **A2058, A2059 et G2505** (+ **A2062** pour les streptogramines), d'autres sites spécifiques sont impliqués, variables selon les molécules (Figure 13) [Garza-Ramos et al., 2001].

Ils empêchent ainsi le transfert du complexe peptidyl-ARNt depuis le site P vers le site A, ce qui entraîne une inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique, le blocage de la formation du pont peptidique et la dissociation précoce du peptidyl-ARNt, hydrolysé par la peptidyl-ARNt hydrolase.

Une interaction avec les **protéines ribosomales L4 et L22** a aussi été suggérée par l'émergence de souches résistantes par mutation au niveau de ces protéines. Leur implication dans la fixation des macrolides demeure cependant mal connue : on ne sait si ces protéines participent directement à la liaison des macrolides ou si des mutations allostériques affectent la conformation de l'ARNr au niveau du site de fixation, entraînant une résistance [Schlunzen et al., 2003].

Concernant la télithromycine, une 1^{ère} hypothèse a été formulée : l'extension (chaîne alkyl-aryl) de la télithromycine et le groupement 3-kéto interagiraient avec deux nouveaux sites : (i) au niveau de 4 acides aminés de la boucle 35 (structure en épingle à cheveux), domaine II, en position A752 ; (ii) et en position U2609, boucle centrale du domaine V (Figure 14) [Xiong et al., 2005]. Cependant, l'interaction avec la boucle 35 du domaine II n'est pas confirmée par les études de cristallographie, mais semble exister aussi pour le dernier kétolide mis au point (K-1325) [Kouvela et al., 2009]. Garza-Ramos et coll. ont montré en 2001 qu'une mutation U2609C rendait *E. coli* résistant aux kétolides, avec maintien de l'efficacité des MLS [Garza-Ramos et al., 2001].

◎ Macrolides

Les macrolides ont une structure hétérosidique caractérisée par un macrocycle lactonique sur lequel viennent se greffer deux ou plusieurs sucres désoxygénés et possédant une fonction basique (cétone pour les macrolides à 14 C, aldéhyde pour les macrolides à 16 C). L'érythromycine, seul composé

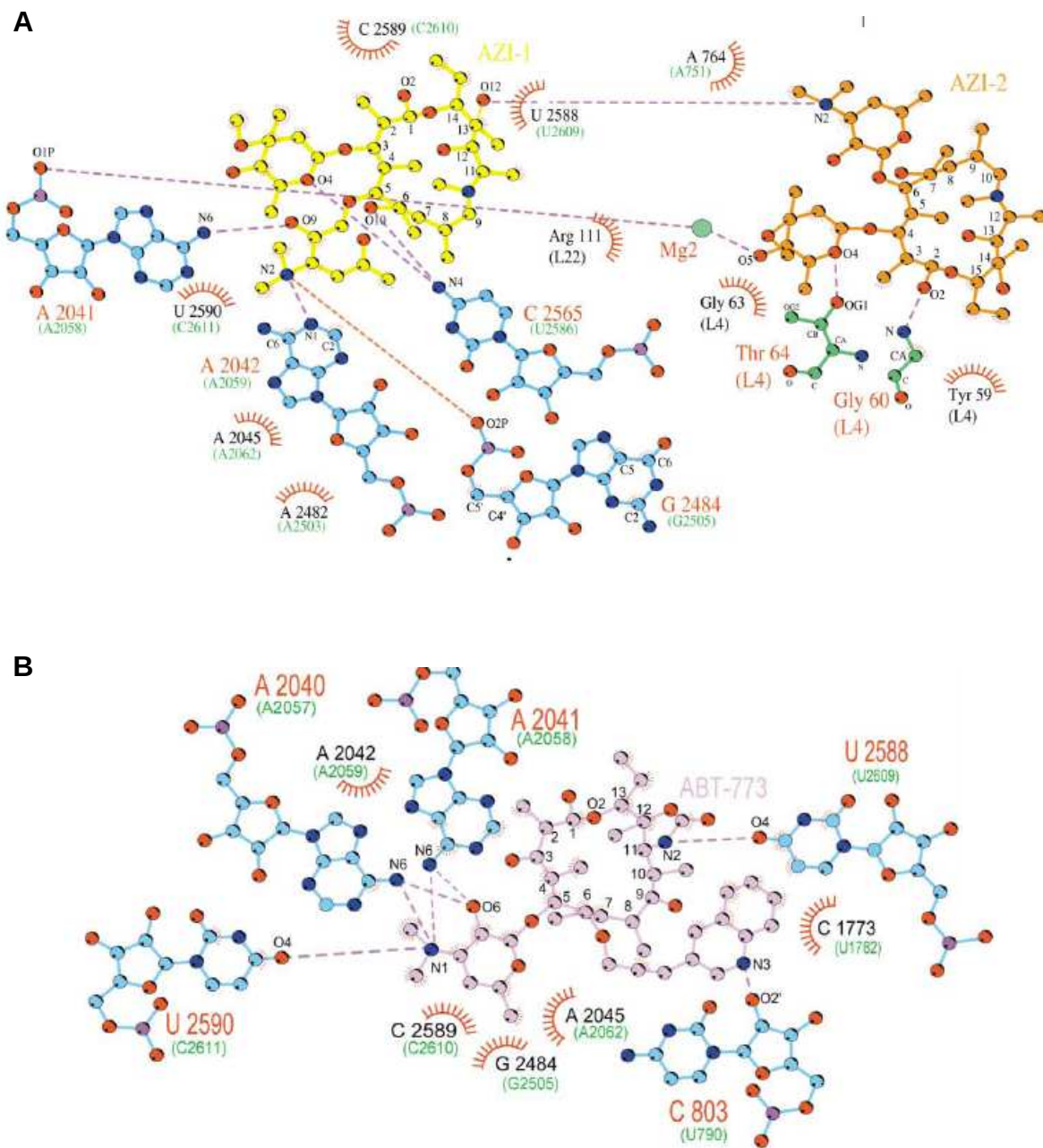


Figure 14 : Sites de fixation au niveau ARN 23S. (A) azithromycine ; (B) : céthromycine. D'après [Shlunzen et al., 2003].

naturel de cette famille, a été isolé aux Philippines à partir de *Streptomyces erythreus*, et commercialisé en 1952, il demeure le chef de file du groupe. Les autres composés sont semi-synthétiques. Les macrolides sont classés en fonction de la taille de leur macrocycle. L'augmentation de la taille du cycle augmente la stabilité et élargit le spectre d'activité des macrolides.

◎ Lincosamides

Les lincosamides sont représentés à l'heure actuelle par deux molécules : la lincomycine (LINCOCINE®) et son dérivé 7-chloro-7-déoxy, la clindamycine (DALACINE®). Ils sont constitués d'un acide hygrique alkylé en position 4 et rattaché via une liaison amide à un groupement 6-amino-thio-octopyrannoside. La lincomycine a été obtenue en 1962 par purification, à partir d'un actinomycète : *Streptomyces lincolnensis*, provenant d'un échantillon de sol prélevé dans la région de Lincoln, dans le Nebraska, aux États-Unis. La clindamycine est un dérivé de la lincomycine, obtenu par voie chimique. Ses avantages par rapport à la lincomycine résident dans une résorption digestive plus complète, une moindre fixation sur les protéines plasmatiques et une meilleure diffusion tissulaire.

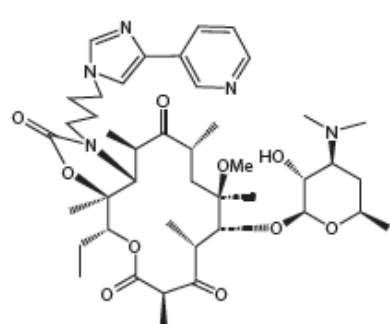
En raison de leur site de fixation commun sur les ribosomes, les lincosamides sont des antagonistes des macrolides (érythromycine) et des phénicolés (chloramphénicol).

◎ Synergistines

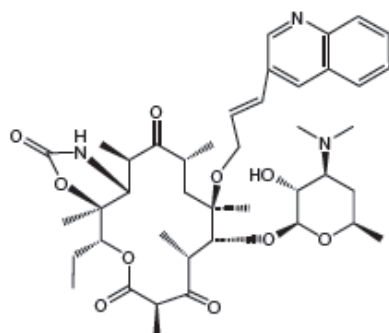
Les synergistines sont des métabolites secondaires à activité antibiotique qui sont produits par certaines espèces de *Streptomyces*. Le groupe des synergistines comprend les pristinamycines, les virginiamycines, les mykamycines et les oestreomycines (ces deux dernières classes n'étant pas utilisées en thérapeutique). Ces composés sont classifiés en deux grandes classes :

- › **le groupe A (ou M)** : ce sont des lactones macrocycliques (macrolactones) (exemples : pristinamycines II et virginiamycines M).
- › **le groupe B (ou S)** : ce sont des hexadepsipeptides cycliques (exemples : pristinamycines I et virginiamycines S) .

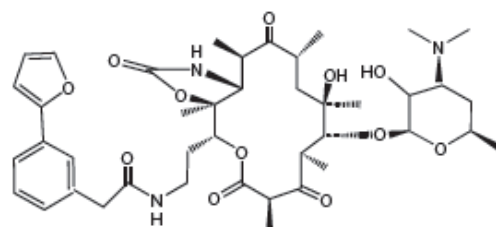
Les pristinamycines sont des composés naturels qui constituent un mélange de métabolites secondaires produits par *Streptomyces pristinae spiralis* ; les constituants majeurs sont la pristinamycine IIA (correspondant à 24-38% du mélange) et la pristinamycine IB (54-68% du



Telithromycin



Cethromycin (ABT-773)



Kosan-1325

Figure 15 : Structure de la télithromycine, céthromycine (ABT773), et du Kosan-1325.

mélange). **Les virginiamycines**, quant à elles, sont des composés naturels qui constituent un mélange de métabolites secondaires produits par *Streptomyces virginiae*. Les pristinamycines et les virginiamycines naturelles sont des composés très difficilement solubles dans l'eau, ce qui limite fortement leur utilisation en thérapeutique.

La modification chimique de ces composés a permis l'élaboration de composés d'hémi-synthèse solubles dans l'eau, tels **la quinupristine** du groupe A et **la dalfopristine** appartenant au groupe B. Deux composés sont commercialisés à l'heure actuelle : Pristinamycine (PYOSTACINE®) et Quinupristine-Dalfopristine (SYNERCID®).

Une synergistine du groupe A associée à une synergistine du groupe B agissent de manière synergique. Elles se fixent sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien et interfèrent par deux mécanismes distincts avec le métabolisme de l'ARN : d'une part, elles s'opposent à l'incorporation de l'ARNt au niveau des ribosomes et, d'autre part, elles empêchent la traduction de l'ARNm. Les composants I et II montrent une synergie marquée : lorsqu'on les associe, on obtient une activité antibiotique plusieurs fois supérieure à celle des composants isolés. *In vitro*, une activité optimale est observée pour 30% de composé de type I et 70% de II, mais *in vivo*, ces proportions s'inversent en raison de la pharmacocinétique défavorable du composant de type II.

☺ Les synergistines peuvent être à l'origine d'un **phénomène de bactériopause** : *in vitro*, les bactéries ne recommencent à croître qu'après plusieurs heures lorsqu'on les place dans un milieu dépourvu d'antibiotique, probablement à cause de la liaison persistante du médicament (surtout du composant II) à sa cible.

☉ Kétolides : télithromycine (KETEK®)

Les kétolides constituent une classe de composés antibiotiques dérivés des macrolides : ce sont des 3-kéto-macrolides. Ce sont des dérivés semi-synthétiques de 2^{ème} génération de l'érythromycine, qui comportent un substituant 3-kéto à la place du sucre de type L-cladinose, et portent un groupement carabamate en position 11,12 ainsi qu'une chaîne alkyl-aryl supplémentaire, liée au niveau du groupement NO₂ du cycle carabamate (télithromycine ou HMR 3647) ou au niveau du cycle lactone en 6-O (céthromycine ou ABT 773). Les kétolides comportent en outre un groupement méthyl en 6-O, tout comme la clarithromycine (Figure 15) [Xiong et al., 2005]. Ces modifications entraînent une

amélioration du spectre d'activité ; la télithromycine montre ainsi une activité très intéressante sur les bactéries résistantes aux macrolides [Zhong & Shortridge, 2001].

1.2.5.2. Phénicolés

Les phénicolés sont des dérivés de l'acide dichloroacétique, porteurs aussi d'un phényl substitué. Le groupement dichloroacétamide est important pour l'activité antibiotique. Le chloramphénicol, fut, historiquement, le 1^{er} antibiotique à large spectre, extrait en 1947 par Ehrlich de *Streptomyces venezuelae* [Ehrlich et al., 1947], mais actuellement obtenu par synthèse. Ce sont des antibiotiques aujourd'hui très rarement prescrits du fait de l'importance et de la fréquence de leur toxicité hématologique. Depuis 1997, le chloramphénicol n'est plus disponible que sous forme de collyre. Dans quelques cas où il demeure seul actif, il reste un antibiotique de dernier recours.

☉ Mécanisme d'action

Bactériostatiques

Les phénicolés se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation, et donc la réaction de transpeptidation.

⊗ L'action du chloramphénicol n'est pas tout à fait spécifique, dans la mesure où elle peut également s'exercer dans les cellules de mammifères, et plus particulièrement, les cellules souches hématopoïétiques.

1.2.5.3. Oxazolidinones : Linézolide (ZYVOXID®)

La classe des oxazolidinones est la première classe nouvelle d'antibiotiques qui soit apparue au cours de ces 30 dernières années. C'est en 1987 que Slee et coll. décrivent pour la première fois des composés appartenant à la classe des oxazolidinones, nommés DuP 105 et DuP 721 (DuPont de Nemours), et développés afin d'être actifs contre les bactéries à Gram +. Le linézolide est actuellement la seule molécule utilisée en clinique [Slee et al., 1987 ; Wilcox, 2005].

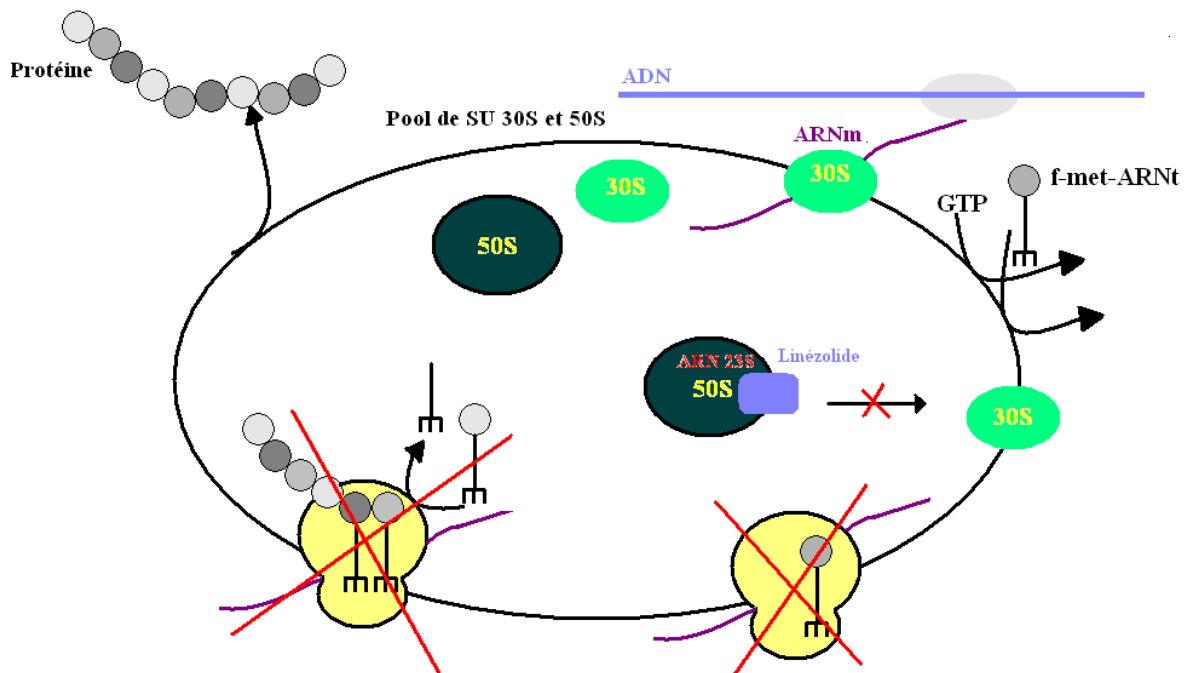


Figure 16 : Mécanisme d'action du linézolide.

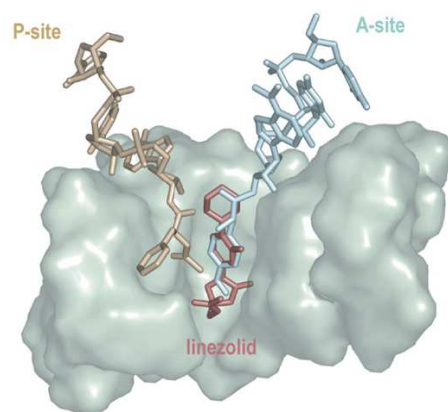


Figure 17 : Modélisation du site de fixation du linézolide. D'après [Leach et al., 2007].

◎ Mécanisme d'action (Figures 16 et 17)

Bactériostatique (bactéricide sur *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *B. fragilis*)

Les composés de type oxazolidinone agissent en inhibant la synthèse protéique à un stade précoce. Ils se fixent directement sur l'ARN 23S de la sous unité 50S du ribosome bactérien, provoquant une distorsion du site de fixation de la N-formyl-méthionine-ARNt-synthétase et empêchant la formation du complexe d'initiation fonctionnel 70S qui est essentiel à la réplication de l'ADN (Figure 16). Ils se fixent par ailleurs au niveau de l'ARN 16S de la sous-unité 30S [Shinabarger et al., 1997 ; Swaney et al., 1998 ; Aoki et al., 2002]. Il a été montré plus récemment que les oxazolidinones interagiraient aussi avec le site A du ribosome, empêchant la fixation de l'aminoacyl-ARNt (Figure 17). Par ailleurs, il semblerait que, chez l'Homme, les oxazolidinones se lient à l'ARN ribosomal au niveau mitochondrial, mais pas sur les ribosomes cytoplasmiques. L'interaction de ces molécules avec les ribosomes mitochondriaux induirait une inhibition de la synthèse protéique au niveau des mitochondries, ce qui pourrait expliquer les effets secondaires (effet myélosuppresseur) observés au décours d'un traitement par linézolide [Leach et al., 2007].

La recherche sur cette nouvelle famille se poursuit. Deux nouveaux composés sont à l'étude à l'heure actuelle : le ranbézolid et l'épérezolid. Le ranbézolid possède une activité intéressante sur les bactéries à Gram + aérobies et anaérobies, ainsi que sur les biofilms formés par *S. aureus* et les Mycobactéries. Par comparaison au linézolide, en plus d'une action inhibitrice de la synthèse des protéines par fixation sur les ribosomes, le ranbézolid inhiberait aussi la synthèse de la paroi, des lipides, et entraînerait des dommages membranaires [Kalia et al., 2008].

1.2.5.4. Aminosides

En 1915, Waksman isole un champignon, *Actinomyces griseus*, qui prendra en 1943 le nom de *Streptomyces griseus*. Une première molécule provenant d' *Actinomyces*, l'actinomycine, se révèle toxique. En 1944, les cultures effectuées par l'un de ses assistants, Albert Schatz, aboutissent à une nouvelle molécule à partir de l'actinomycine de 1915. Le produit est administrable à l'Homme et enrichi d'une activité antibiotique *in vitro*. Waksman, Schatz et l'un de leurs collaborateurs, Bugie,

démontrent l'efficacité de ce nouveau produit, la streptomycine, sur plusieurs bactéries, dont le bacille tuberculeux [Schatz et al., 1944 ; Schatz & Waksman, 1944].

Les aminosides, encore appelés aminoglycosides, sont des **molécules polaires et polycationiques**. Leur structure de base commune comporte un aminocyclitol, auquel se lient par des ponts glycosidiques, 2 (ou exceptionnellement 3) oses. Ces cycles peuvent porter des substituants dont les plus importants sont les groupes hydroxyles et les groupes basiques.

On sépare les différents composés selon leur origine : naturelle ou synthétique. Les premiers aminosides découverts étaient produits par des souches de *Streptomyces* (streptomycine, néomycine, kanamycine, tobramycine) ou d'*Actinomyces* (gentamicine, sisomicine). La streptomycine, 1^{ère} molécule isolée et utilisée, était très active sur les Mycobactéries, ce qui a permis de révolutionner le traitement de la tuberculose. Hélas, cette molécule n'a aujourd'hui plus guère d'intérêt puisque, du fait d'une utilisation excessive en monothérapie et par le jeu des résistances bactériennes, les mycobactéries sont presque toutes devenues résistantes. Ces composés naturels ont servi de base pour l'élaboration de produits semi-synthétiques (amikacine, isépaamicine, nétilmicine), développés afin d'obtenir des molécules insensibles à l'inactivation par les bactéries devenues résistantes aux aminosides naturels. Ces composés se sont aussi avérés moins toxiques que les composés de base.

Selon leur structure, on distingue deux groupes d'aminosides :

› **le groupe de la streptidine** : le chef de file est la streptomycine, ce groupe est basé sur une structure associant une streptidine à un pentose (streptose) et à une glucosamine.

› **le groupe des dérivés de la 2-désoxystreptamine** :

- désoxystreptamine substituée en 4,5 : néomycine, paromomycine, framycétine.
- désoxystreptamine substituée en 4,6 : kanamycine, gentamicine (GENTALLINE®), isépaamicine (ISEPALLINE®), nétilmicine (NETROMYCINE®), tobramycine (NEBCINE®), amikacine (AMIKLIN®).

Remarque

☺ les aminosides dérivés de la bactérie *Streptomyces* s'écrivent avec un "y" : **-mycine**.

☺ les aminosides provenant d'*Actinomyces* s'écrivent avec un "i" : **-micine**.

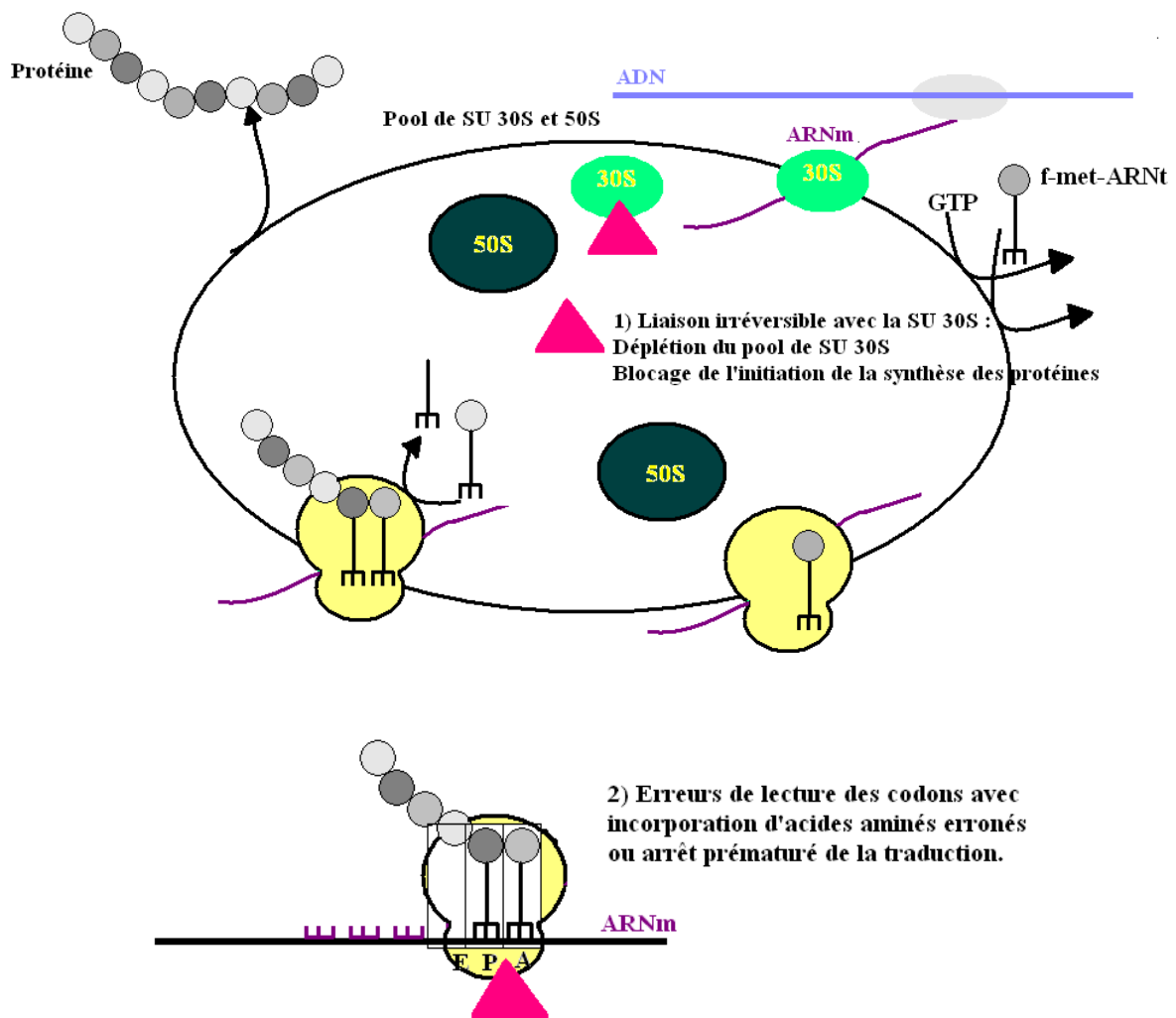


Figure 18 : Mécanisme d'action des aminosides (représenté par un triangle rose sur le schéma).

◎ Mécanisme d'action (Figure 18)

Bactéricides.

Les aminosides se comportent, sur le plan chimique, comme des **polycations**. Cette particularité leur permet de se concentrer dans l'environnement immédiat des bactéries par attraction des charges négatives de la bactérie. Celles-ci se trouvent essentiellement au niveau des groupements phosphate du LPS et des phospholipides de la membrane externe des bactéries à Gram -, et au niveau des acides teichoïques enchâssés dans le peptidoglycane des bactéries à Gram +. Chez les bactéries à Gram -, cette concentration rapide et importante autour de la bactérie est suivie d'une pénétration rapide par les porines. La traversée du peptidoglycane est aisée chez les bactéries à Gram + (les aminosides étant de petites molécules hydrophiles), et un 2^{ème} phénomène de concentration s'opère à proximité de la membrane cytoplasmique (groupements phosphate des phospholipides). Les mécanismes de pénétration impliquent alors des systèmes de transport actif, qui sont les enzymes de la respiration (catalases, oxydases, cytochromes) situées dans la membrane cytoplasmique des bactéries aérobies strictes ou anaérobies facultatives. Ceci explique pourquoi les bactéries dépourvues de ces enzymes ne sont pas ou peu sensibles aux aminosides (anaérobies strictes, ou facultatives mais à dominante anaérobie comme les streptocoques) [Jehl et al., 2004].

Ils agissent par fixation sur l'ARNr 16S, au niveau de la **sous-unité 30S** du ribosome bactérien, entraînant un changement morphologique de l'ensemble du ribosome et une altération de toutes les étapes de la synthèse des protéines. Un des sites de fixation est **A1408** (modifié chez certaines souches résistantes) ; chez les eucaryotes, la position 1408 est occupée par une guanine, ce qui explique l'affinité moindre des aminosides pour les ribosomes cellulaires. En raison des nombreuses erreurs de lecture, il y a synthèse de protéines anormales, incorporées ensuite dans la membrane cytoplasmique, qui va perdre son intégrité et favoriser une augmentation de la pénétration des aminosides. En présence de concentrations importantes d'aminosides, il y a déplétion du pool de SU 30S entraînant un arrêt de la synthèse des protéines. La bactéricidie rapide des aminosides résulte donc essentiellement de l'arrêt de la synthèse protéique et de la perte d'intégrité membranaire. Un autre phénomène est évoqué, qui serait une inhibition de la réplication de l'ADN.

Les aminosides sont caractérisés par une **activité concentration-dépendante**, indépendante de l'effet inoculum, et par un **effet post-antibiotique**.

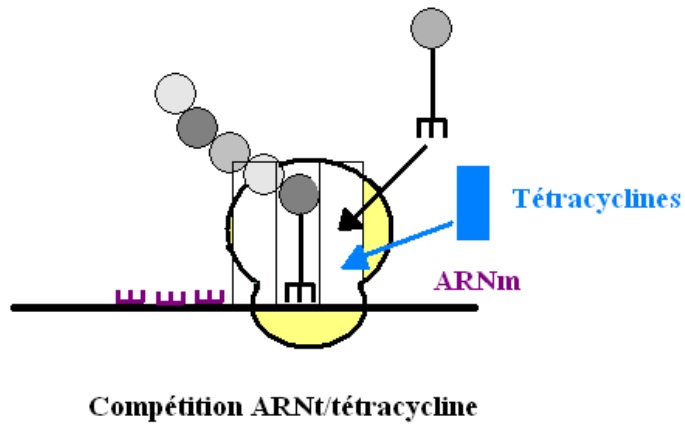


Figure 19 : Mécanisme d'action des tétracyclines.

Par encombrement stérique, inhibent la liaison de l'aminoacyl-ARNt avec le complexe ARNm/ribosome.

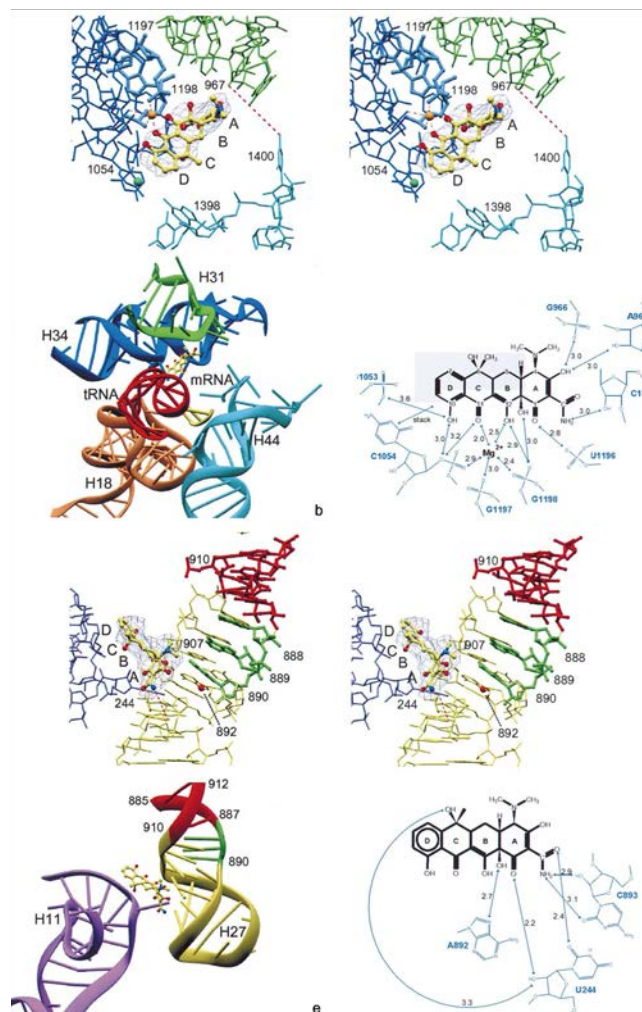


Figure 20 : Interactions entre la tétracycline et la SU 30S du ribosome. D'après [Brodersen et al., 2000].

1.2.5.5. Tétracyclines

La tétracycline a été découverte en 1948 par Benjamin Dugar [Dugar, 1948]. Les tétracyclines sont des antibiotiques isolés de souches de *Streptomyces*, et aujourd'hui obtenus par hémisynthèse [Love et al., 1954 ; Yalcindag, 1955]. Ils doivent leur nom à leur structure tétracyclique commune (noyau naphtacène-carboxamide), sur laquelle viennent se greffer des substituants. Les tétracyclines présentent un caractère amphipathique : le tétracycle est hydrophobe alors que certains substituants sont hydrophiles. L'hydrophobicité résultante, propre à chaque molécule, va régir la pharmacocinétique du composé et surtout sa distribution tissulaire.

En fonction de leur temps de demi-vie, on peut distinguer les tétracyclines :

▸ 1^{ère} génération : chlortétracycline, oxytétracycline, tétracycline. Ce sont des tétracyclines naturelles, obtenues par extraction à partir de *Streptomyces*, présentant une mauvaise tolérance digestive et nécessitant un nombre important de prises (6/j). Elles ne sont plus commercialisées.

▸ 2^{ème} génération : doxycycline (TOLEXINE®), minocycline (MYNOCINE®). Ce sont des tétracyclines hémisynthétiques, caractérisées par une meilleure tolérance digestive et une pharmacocinétique améliorée.

☹ Les indications des tétracyclines sont actuellement limitées : d'autres antibiotiques présentent le même spectre d'activité, sans les effets secondaires des tétracyclines. De plus, ils ne sont pas utilisables chez la femme enceinte et les enfants de moins de 8 ans, et il existe une résistance acquise élevée parmi les bactéries fréquemment responsables d'infections (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.).

☉ **Mécanisme d'action** (Figures 19 & 20)

Bactériostatiques.

Les tétracyclines pénètrent dans les bactéries par les porines OmpF et OmpC, sous forme complexée aux cations Mg^{2+} . Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en se fixant sur l'ARN 16S de la sous unité 30S du ribosome bactérien. Le nombre de copies de l'opéron codant l'ARNr est variable selon les espèces bactériennes. Il existe 6 sites de fixation, nommés Tet1 à Tet6. Le taux d'occupation de ces différents sites est variable (la plus grande affinité étant généralement pour Tet1). Les tétracyclines interagissent avec les hélices 31, 34 et 44 qui sont les sites de liaison de l'ARNt. Par

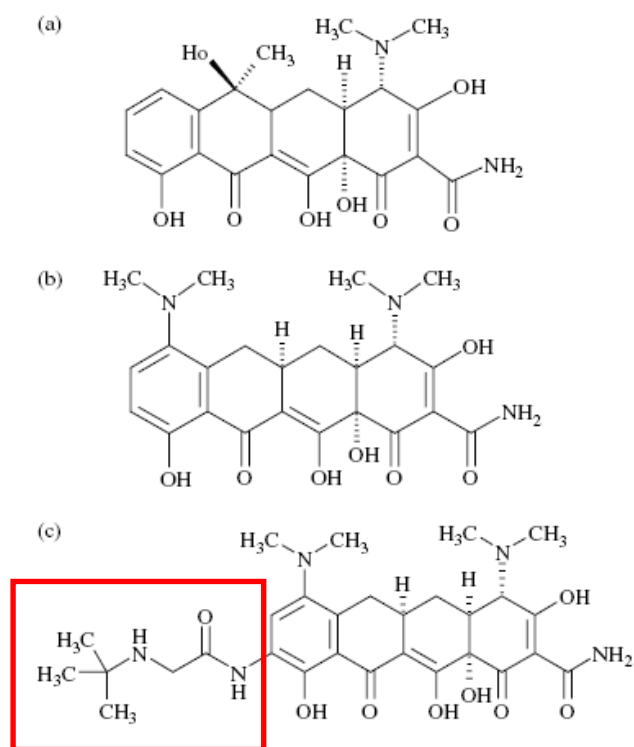


Figure 21 : Structure de la (a) tétracycline, (b) minocycline, (c) tigécycline.

encombrement stérique, elles empêchent ainsi la liaison de l'aminocyl-ARNt sur le complexe ARNm-ribosome. De plus, elles interfèrent avec les systèmes enzymatiques de la bactérie par un mécanisme de complexation ionique (Mg^{2+} en particulier) [Brodersen et al., 2000 ; Pioletti et al., 2001 ; Zakeri & Wright, 2007].

☺ Un point sur la tigécycline (TYGACIL®)

Les glycylicyclines ont été découvertes en 1993, ce sont des analogues structuraux des tétracyclines, synthétisés avec pour objectif de contrer la résistance médiée par des systèmes d'efflux ou de protection des ribosomes [Livermore, 2005 ; Noskin, 2005 ; Doan et al., 2006]. La tigécycline, 1^{er} membre de la famille des glycylicyclines, est un dérivé structural de la minocycline par addition d'une chaîne tert-butyl-glycylamido au niveau du carbone 9 du cycle D du noyau tétracycline (Figure 21).

De même que les tétracyclines, la tigécycline se fixe de manière réversible au niveau de l'hélice 34 de la sous-unité 30S du ribosome, empêchant la fixation de l'aminocyl-ARNt au niveau du site A. Malgré ce mécanisme commun, la tigécycline est capable de contrer les résistances développées par les bactéries contre les tétracyclines. L'insensibilité de la tigécycline à ces mécanismes serait due à l'existence de la chaîne latérale supplémentaire : (i) les liaisons à la sous-unité 30S du ribosome seraient plus fortes, et (ii) cette chaîne augmenterait l'encombrement stérique de la molécule, empêchant la prise en charge par les systèmes d'efflux [Doan et al., 2005].

La tigécycline a été approuvée par la FDA en juin 2005. Les indications sont le traitement des infections compliquées de la peau et des tissus mous, ainsi que les infections abdominales compliquées, chez les patients de plus de 18 ans. La tigécycline possède un spectre d'activité plus large que les tétracyclines (*S. aureus*, *Enterococcus* spp., *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis*, et la plupart des Entérobactéries), avec une activité conservée sur les SARM, les Entérocoques Résistants aux Glycopeptides (ERG), et les Entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE). Cependant, cette molécule n'a aucune activité sur *P. aeruginosa*, et une activité très réduite sur *Proteus mirabilis* [Livermore, 2005 ; Noskin, 2005].

A l'exception d'effets indésirables gastro-intestinaux, la tigécycline serait plutôt bien tolérée. Reste que cette nouvelle molécule, dite appartenant à la « nouvelle » famille des glycylicyclines, présentent les mêmes effets indésirables (phototoxicité, coloration des dents), et les mêmes contre-indications (enfants, femmes enceintes) que les tétracyclines [Doan et al., 2006].

1.2.5.6. Acide fusidique (FUCIDINE®)

Dans les années 1960-1970, un composé issu de la fermentation du champignon *Fusidium coccineum* s'avéra actif sur *Staphylococcus* spp., et fut appelé acide fusidique. L'acide fusidique est aussi isolé à partir de *Mucor ramannianus* et de *Isaria kogana*. La structure générale de l'acide fusidique est très voisine de celle des hormones stéroïdiennes. Toutefois, cet antibiotique est complètement dépourvu d'effet hormonal.

☉ Mécanisme d'action

Bactériostatique à faibles doses et bactéricide à des doses plus élevées.

L'acide fusidique agit en inhibant la synthèse protéique, en se fixant au facteur EF-G d'élongation de la traduction, ce qui empêche la fixation des amino-acyl-ARNt.

1.3. Relations structure-activité

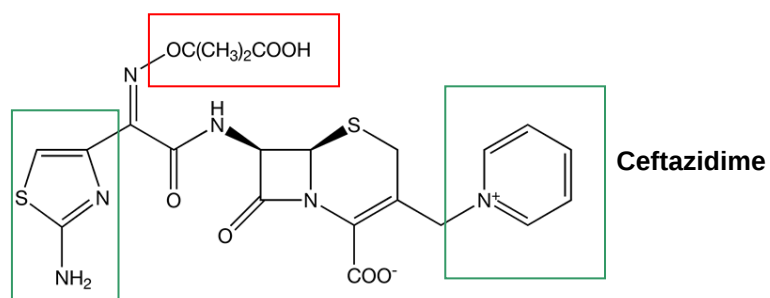
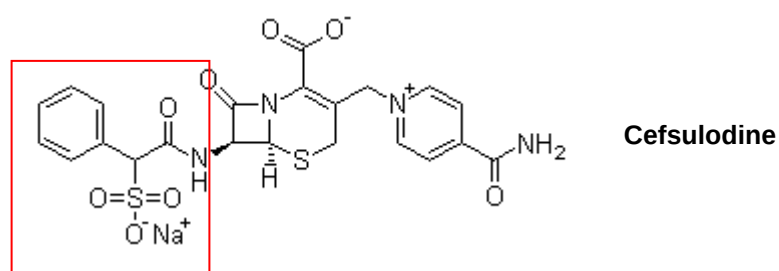
L'exploration des relations structure-activité (RSA) constitue une des bases nécessaires afin de pré-sélectionner ou de sélectionner une nouvelle molécule pour en faire un médicament. Ce principe s'applique aux molécules antibactériennes. L'intérêt de connaître les RSA est double : optimiser les propriétés d'une nouvelle molécule et apporter une aide à la synthèse et/ou à la sélection d'une nouvelle molécule... Sans compter pallier aux mécanismes de résistance déjà identifiés chez les bactéries !! La vraie question est de connaître quelles sont les caractéristiques de la molécule que l'on souhaite optimiser : (1) l'activité antibactérienne, (2) la non-susceptibilité aux mécanismes de résistance bactérienne identifiés actuellement, (3) les performances pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, (4) les paramètres physico-chimiques (solubilité, absorption, diffusion tissulaire), (5) la tolérance des molécules (réduction des effets secondaires).

1.3.1. Exemple des β -lactamines

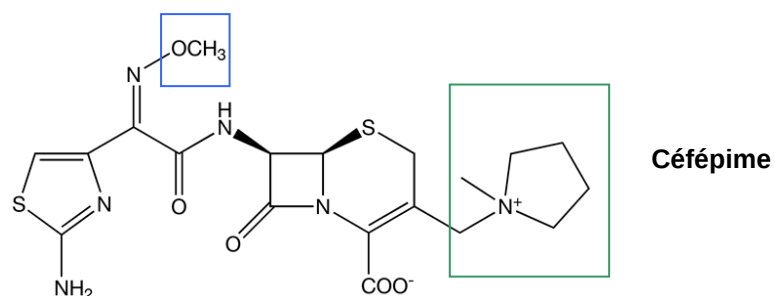
1.3.1.1. RSA & activité antibactérienne

Le noyau central, avec la liaison carbonyl-lactame, est indispensable, bien que dépourvu d'activité antibactérienne propre. La chaîne latérale (R), joue aussi un rôle primordial [Bryskier, 2006]. Par

1) Amélioration de la pénétration à travers la membrane externe des bactéries à Gram -



2) Amélioration de l'activité sur *P. aeruginosa*



3) Amélioration de la stabilité à l'hydrolyse par les BLSE

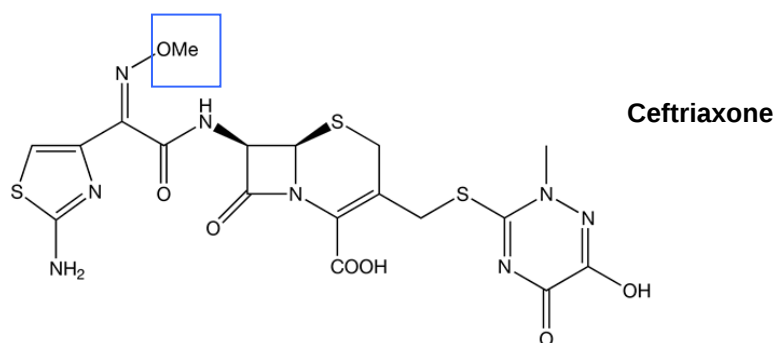


Figure 22 : Exemples de relations structure-activité pour les céphalosporines.

modification des cycles, et des substituants, il est possible de jouer sur différents paramètres (Figure 22) :

- **Amélioration de la pénétration au travers de la paroi des bactéries à Gram –**

Elle est fonction de la taille des molécules, de leur hydrophilie, et de leur charge. Ainsi, la substitution en α de la chaîne latérale en position 6 par un groupement HSO_3^- (cefsulodine) ; ou par un groupement acide isobutyrique sur l'oxime (ceftazidime) permet d'augmenter la concentration de ces céphalosporines au niveau du périplasma, par amélioration de la pénétration à travers la membrane externe des bactéries à Gram- [Bryskier, 2006].

- **Amélioration de l'activité sur *P. aeruginosa***

L'affinité des céphèmes pour leur cible est médiée par le **cycle 2-amino-5-thiazolyle** situé sur la chaîne latérale en position 7 du noyau céphème. C'est ce cycle, avec une variante, le **cycle 5-amino-diathiazole**, qui permet d'augmenter l'activité sur *P. aeruginosa*, en optimisant l'affinité pour les PLP [Bryskier, 2006]. La deuxième découverte permettant d'augmenter l'activité sur *P. aeruginosa* et *S. aureus* a été celle des **structures de type ammonium quaternaire en position 3 du noyau céphème** (cefpirome, céfépime), du fait du caractère zwitterionique des molécules.

- **Amélioration de la stabilité à l'hydrolyse par les BLSE**

La stabilité à l'hydrolyse par les BLSE a été obtenue par la substitution du carbone en position α par un reste de type oxi-imine. Ce reste est le plus souvent substitué par un **groupement méthyl** qui agit par encombrement spatial protégeant la liaison carbonyl-lactame. C'est le cas de la ceftriaxone et du céfotaxime [Bryskier, 2006].

1.3.1.2. RSA & propriétés pharmacocinétiques

L'allongement de la demi-vie d'élimination permet de réduire le nombre de prises journalières. Cette amélioration a été obtenue pour plusieurs céphalosporines. Citons par exemple la ceftriaxone, dont le noyau sur la chaîne latérale en position 3 du noyau céphème a permis d'obtenir une demi-vie supérieure à 8 h : cela repose sur la substitution du groupement hydroxyl par un cycle triazine (Figure 22).

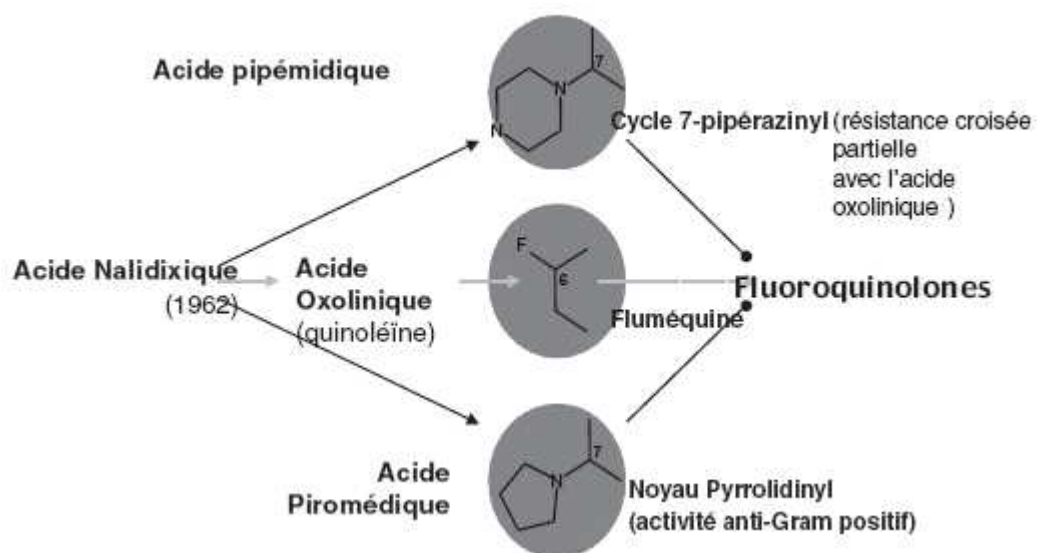


Figure 23 : Genèse des fluoroquinolones, d'après [Bryskier et al., 2006].

1.3.1.3. RSA & effets indésirables

Les troubles de l'hémostase ont été décrits à l'origine pour la benzylpénicilline. La relation entre la structure et les saignements ont été étudiés principalement avec la carbénicilline et les céphalosporines. La carbénicilline est une α -carboxy-pénicilline dont le carbone en position α est substitué par un groupement carboxylique. Ce groupement a été rendu responsable des saignements par une anomalie de l'agrégation plaquettaire [Bryskier, 2006].

Nous prendrons comme second exemple la présence d'un **noyau thiométhyl-tétrazole** sur la chaîne latérale en position 3, que l'on retrouve par exemple dans la structure du céfamandole. Ce groupement augmente de façon très importante l'activité antibactérienne. Cependant, il a été montré qu'il est aussi responsable de **troubles importants de la coagulation** par interférence avec le métabolisme de la vitamine K ; de plus il est responsable d'une intolérance à l'alcool par effet antabuse. Ces troubles parfois graves de la coagulation ont conduit à l'arrêt de sa commercialisation malgré une activité antibactérienne très intéressante [Bryskier, 2006].

Les pénèmes et les carbapénèmes sont hydrolysés par une enzyme d'origine rénale : la dihydropeptidase (DHP-1). Les produits issus de cette hydrolyse sont inactifs et seraient responsables du potentiel néphrotoxique de ces molécules. La **substitution du carbone en position 1** par un groupement méthyl en position β permettrait de réduire ce métabolisme.

1.3.2. Exemple des fluoroquinolones

1.3.2.1. RSA & activité antibactérienne

L'acide nalidixique est un dérivé de type 1,8 naphthyridone, non substitué. Une augmentation de l'activité antibactérienne a été obtenue avec un dérivé de type quinoléine, l'acide oxolinique. Le spectre antibactérien de ces molécules était pourtant limité à certaines Entérobactéries. La substitution en 7 des pyridinones β -carboxyliques par un cycle pipérazine (acide pipémidique) ou pyrrolidine (acide piromédique) a donné des molécules avec un élargissement du spectre antibactérien. La 2^{ème} découverte fut celle de l'intérêt de l'ajout d'un atome de fluor (fluméquine). L'association d'un noyau 7-pipérazinyl substitué ou non, et d'un atome de fluor a donné naissance aux fluoroquinolones (Figure 23) [Bryskier, 2006].

Une autre découverte primordiale fut la mise en évidence de l'augmentation de l'activité (y compris sur *P. aeruginosa*) de ces molécules par la chaîne cyclopropyle (ciprofloxacine), remplaçant la chaîne éthyl en position N1 (norfloxacine, péfloxacine). D'autres chaînes ont été essayées, sans grand succès.

Une augmentation de l'activité sur les cocci à Gram + a été obtenue avec un cycle de type pyrrolidinyle substitué ou non, ou bicycliques (moxifloxacine). La substitution par un cycle 7-azétidinyle permettrait d'augmenter l'activité antibactérienne, mais il semblerait que ce noyau soit responsable d'effets secondaires de type hépatotoxicité. L'activité sur *Mycobacterium tuberculosis*, serait, quant à elle, favorisée par la présence d'un noyau de type quinoléine [Bryskier, 2006].

Le mode d'action des quinolones se caractérise par une interaction spécifique avec l'ADN gyrase et la topoisomérase IV bactérienne, et non pour la topoisomérase II humaine. La structure chimique a été démontrée responsable de cette affinité. Ainsi, pour la lévofloxacine, la substitution en 4' du cycle pipérazinique et de la position 4 du groupement méthyl intervient dans la sélectivité, de même que le remplacement de l'atome d'oxygène par un atome de soufre ou de carbone [Bryskier, 2006].

1.3.2.2. RSA & propriétés pharmacocinétiques

La norfloxacine, une fluoroquinolone de type 7-pipérazynil, est modérément et uniquement absorbée par voie orale. La substitution de l'azote en position 4' du cycle pipérazinyl par un groupement méthyle (péfloxacine), a permis d'obtenir une molécule absorbée à 100%, et une double formulation, orale et intraveineuse [Bryskier, 2006].

1.3.2.3. RSA & effets indésirables

Les fluoroquinolones se caractérisent par un certain nombre d'effets indésirables majeurs, dont la phototoxicité. Il a été mis en évidence que la présence en position 8 d'un atome de fluor était inducteur de phototoxicité. Les travaux de diverses équipes ont montré que les groupements les plus favorables sont les groupes méthyl et méthoxy [Bryskier, 2006].

1.3.3. Relations structure-activité des différentes classes d'antibiotiques

Tableau I : Relations structure-activité des principales familles d'antibiotiques.

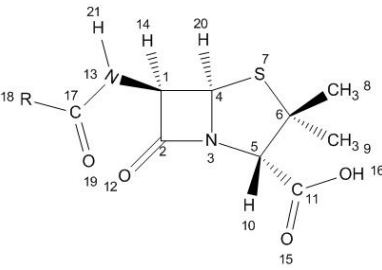
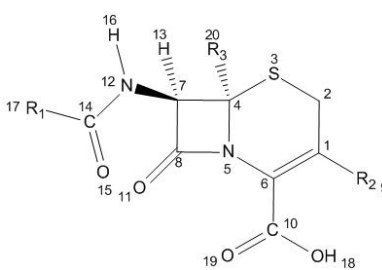
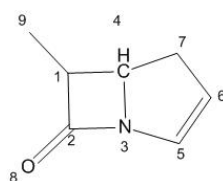
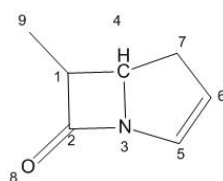
Famille ou Classe d'antibiotiques	Relations structure/activité	Structure chimique
Antibiotiques inhibant la biosynthèse de la paroi bactérienne		
Pénicillines	<u>Noyau de base</u> : acide 6-aminopénicillanique (cycle thiazolidine lié au cycle β -lactame)	
	Substitution par acylation sur sa fonction aminée	
	Différenciation des molécules par le radical R :	
	→ amélioration absorption par voie orale : pénicillines A	
	→ protection contre l'hydrolyse par les pénicillinases staphylococciques : radical volumineux protégeant le cycle β -lactame	
Céphalosporines	<u>Noyau de base</u> : acide 7-aminocéphalosporanique	
	Substitution en C ₃ par des gpts électro-capteurs = meilleure délocalisation des électrons au niveau du cycle β -lactame entraînant une amélioration de l'activité sur les transpeptidases.	
	☺ chaîne latérale R1	
	Conditionne l'activité antibactérienne et la résistance aux β -lactamases (plus R1 est encombrant, plus hydrolyse importante).	
	☺ chaîne R2	
Carbapénèmes	Détermine les propriétés pharmacocinétique.	
	☺ chaîne R3	
	Protège le groupe β -lactame.	
	Dérivés de la thiénamycine.	
	☺ Présence d'une double liaison, atome de soufre du cycle thiazolidine remplacé par un atome de carbone.	
Carbapénèmes	☺ Chaîne latérale : grande stabilité vis-à-vis des β -lactamases.	
	☺ Chaîne latérale thio-alcoyle : renforce l'activité vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> .	

Tableau I (suite) : Relations structure-activité des principales familles d'antibiotiques.

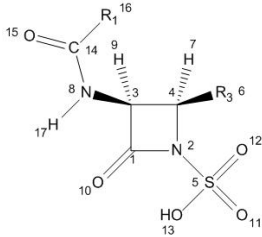
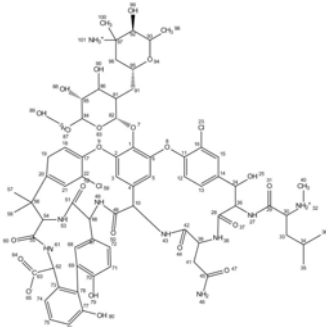
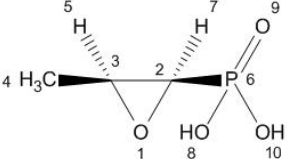
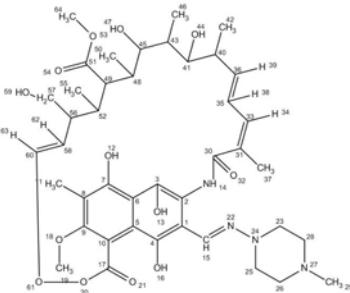
Famille ou Classe d'antibiotiques	Relations structure/activité	Structure chimique
Antibiotiques inhibant la biosynthèse de la paroi bactérienne		
Monobactames	β-lactames monocycliques Groupe méthyl en 4 : stabilité aux β-lactamases Chaîne latérale en 3 volumineuse : spectre étendu aux Gram – et sur <i>Pseudomonas</i>.	
Glycopeptides	Heptapeptide cyclique sur lequel viennent se greffer des sucres mannose et glucosamine (teicoplanine) glucose et vancosamine (vancomycine).	
Fosfomycine	Acide phosphonique RSA ??	
Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique		
Polymyxines	Peptide cyclique RSA ??	
Daptomycine	Lipopeptide cyclique polyanionique RSA ??	
Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques		
Rifamycines	Noyau naphthalène : N-amino-N'-méthylpipérazine-hydrazone RSA ??	

Tableau I (suite) : Relations structure-activité des principales familles d'antibiotiques.

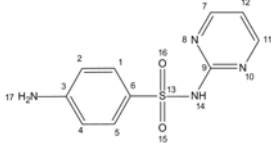
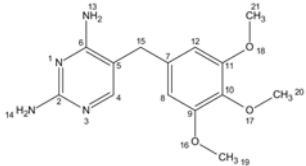
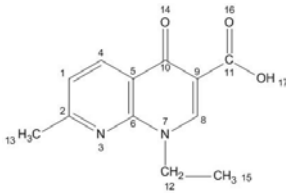
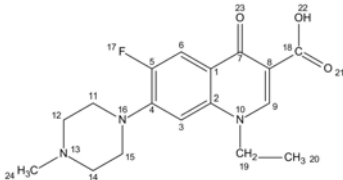
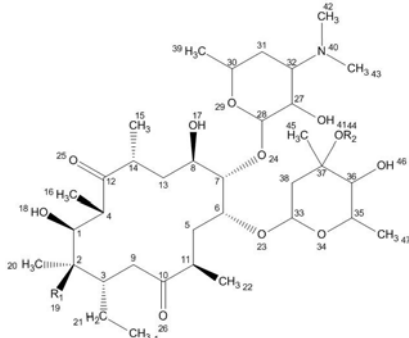
Famille ou Classe d'antibiotiques	Relations structure/activité	Structure chimique
Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques		
Sulfamides	<u>Sulfamides</u> : dérivés de l'acide para-aminobenzène sulfonique (ou acide para-aminobenzoïque, PABA) RSA ??	
Triméthoprim	<u>Triméthoprim</u> : cycle diaminopyridine + substituants RSA ??	
Quinolones Fluoroquinolones	Noyau de base : acide quinoléine-3-carboxylique avec gpt pipérazinyl en 7 et atome de fluor en 6. Molécules diffèrent par la substitution de N1, en para du gpt pipérazinyl, du C8 par N8. Les 1^{ères} générations portent en position 7 un cycle à 6 C, les 2^{èmes} générations présentent un cycle plus petit. ☺ COOH en 3 et C=O en 4 : essentiels à l'activité antibactérienne (permettent la fixation de la molécule sur ADN gyrase). ☺ double liaison en 2-3 ne doit être ni réduite, ni substituée. ☺ cycle B doit être aromatique. ☺ substituant en 2 défavorable : encombrement stérique qui gêne la fixation ☺ encombrement de N1 : pouvoir antibactérien. ☺ fluor en 6 et substituant en 7 : augmentent activité, élargit le spectre, améliore la diffusion (par augmentation de la lipophilie).	 
Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines		
Macrolides	<u>Macrocycle lactonique</u> (comprenant un ensemble de 14, 15 ou 16 atomes) - Sucre aminé attaché en position 5 du macrocycle, appelé désosamine - Sucre neutre attaché en position 3, appelé cladinose (sauf pour les kétolides) - Erythromycine : fonction cétone en position 9 du macrocycle, qui lui confère une instabilité en milieu acide	

Tableau I (suite) : Relations structure-activité des principales familles d'antibiotiques.

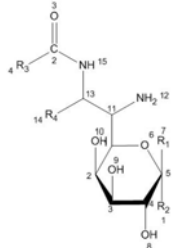
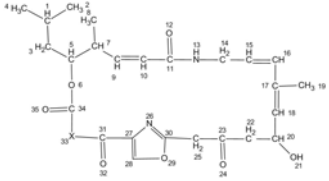
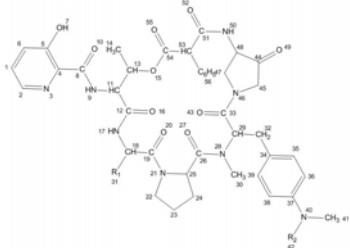
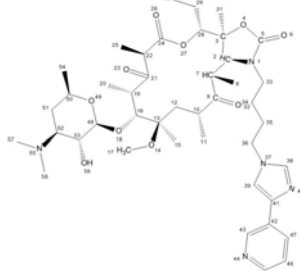
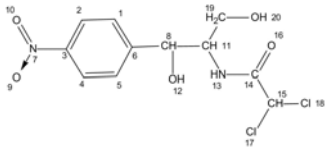
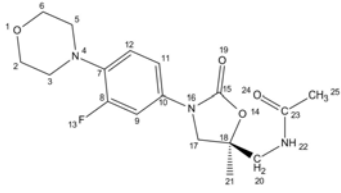
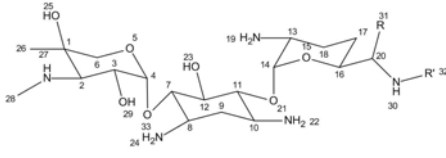
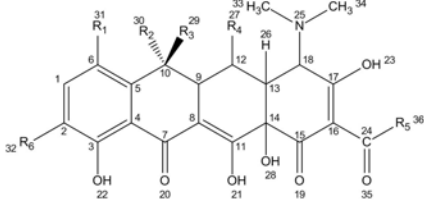
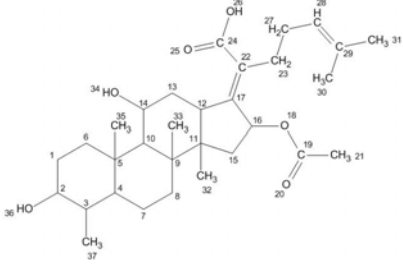
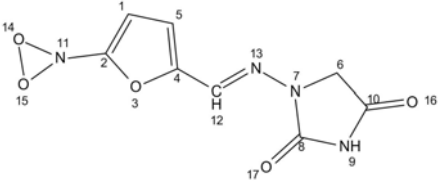
Famille ou Classe d'antibiotiques	Relations structure/activité	Structure chimique
Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines		
Lincosanides	Acide hygrique alkylé en position 4 et substitué via une fonction amide par un groupement 6-amino-thio-octopyrannoside RSA ??	
Synergistines	groupe A : lactones macrocycliques groupe B : hexadepsipeptides cycliques	 
Kétolides	Dérivés semi-synthétique de 2 ^{ème} génération de l'érythromycine - substituant 3-kéto à la place du sucre de type L-cladinose - groupement méthyl en 6-O - groupement carbamate en position 11-12 - chaîne aryl-alkyl supplémentaire (augmentation de l'activité, absence de résistance croisée avec les MLS)	
Phénicolés	Dérivés de l'acide dichloroacétique, porteurs aussi d'un phényle substitué. Groupement dichloroacétamide : rôle +++ dans activité	
Oxazolidinones	RSA ??	

Tableau I (suite) : Relations structure-activité des principales familles d'antibiotiques.

Famille ou Classe d'antibiotiques	Relations structure/activité	Structure chimique
Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines		
Aminosides	Structure de base : aminocyclitol (cycle à 6 chaînons avec des groupements amines), auquel se lient par des ponts glycosidiques 2 (ou exceptionnellement 3 dans la néomycine) hexoses. - L'<u>aminocyclitol</u> est soit la streptidine (dans la streptomycine) ou la 2-déoxystreptamine (dans tous les autres aminoglycosides). - Les <u>sucres</u> sont liés à l'aminocyclitol en position 4 et 6 pour l'ensemble des aminoglycosides, à l'exception de la néomycine pour lesquelles les sucres sont liés en position 4 et 5.	
Tétracyclines	Noyau perhydro-naphtacène-carboxamide. Substitution en 5,6,7 ou 2. ☺ Absence du gpt OH en C6 : plus grande liposolubilité. ☺ Gpt basique N-amidinodiméthyle en C4 indispensable à l'activité. Tigécycline : chaîne tert-butyl-glycylamido en position 9 du cycle D (non susceptibilité aux mécanismes de résistance aux tétracyclines)	
Acide fusidique	RSA ??	
Antibiotiques « inclassables »		
Nitrofuranes	RSA ??	

II. Antiseptiques cationiques : cibles et mécanismes d'action

Les antiseptiques sont utilisés depuis des siècles, comme agent conservateur de l'eau ou des aliments, mais aussi par exemple dans l'art de la momification (balsamines). Des composés variés possédant des propriétés anti-infectieuses (vinaigre, vin, miel, chlorure mercurique...) sont utilisés depuis l'Antiquité, de façon empirique, pour la désinfection des plaies. Le développement de l'antisepsie chirurgicale remonte au 19^{ème} siècle, avec l'introduction de l'usage de désinfectants. Les 1^{ers} agents introduits à cette période étaient des dérivés halogénés (relargant du chlore) et le peroxyde d'hydrogène. D'autres composés tels que les ammoniums quaternaires (QAC, « Quaternary Ammonium Compounds ») ou la chlorhexidine ont été introduits plus récemment. Une étude récente, menée en dermatologie (773 dermatologues de ville), a montré que les six traitements les plus utilisés sont l'hexamidine (37%), l'association chlorhexidine-chlorure de benzalkonium (28%), la CHX alcoolique (16,5%), la chlorhexidine en solution aqueuse (7%), la polyvidone iodée (6%), et l'association hexamidine-chlorhexidine (1,8%) [Caumes et al., 2006].

2.1. Classification

2.1.1. Ammoniums quaternaires (QAC, « Quaternary Ammonium Compounds »)

Sous le terme d'ammoniums quaternaires sont regroupés un ensemble de molécules aux propriétés biologiques diverses : curarisants, muscariniques, inhibiteurs neuro-musculaires, et anti-infectieux. Les ammoniums quaternaires sont des composés bipolaires comportant un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe cationiques. Ces propriétés en font des agents surfactifs cationiques avec une activité antibactérienne et détergente. Les ammoniums quaternaires ont été largement utilisés comme antiseptiques de la peau, des plaies et des muqueuses ; en effet, en plus de leurs propriétés antiseptiques, ce sont des agents mouillants qui s'étalent à la surface de la peau et des muqueuses, ce qui facilite la pénétration jusqu'aux infractuosités [Fleurette et al., 1995].

La structure générale des ammoniums quaternaires est assez simple : association entre un groupement nitrogène quaternaire et au moins un substituant hydrophobe (Figure 24).

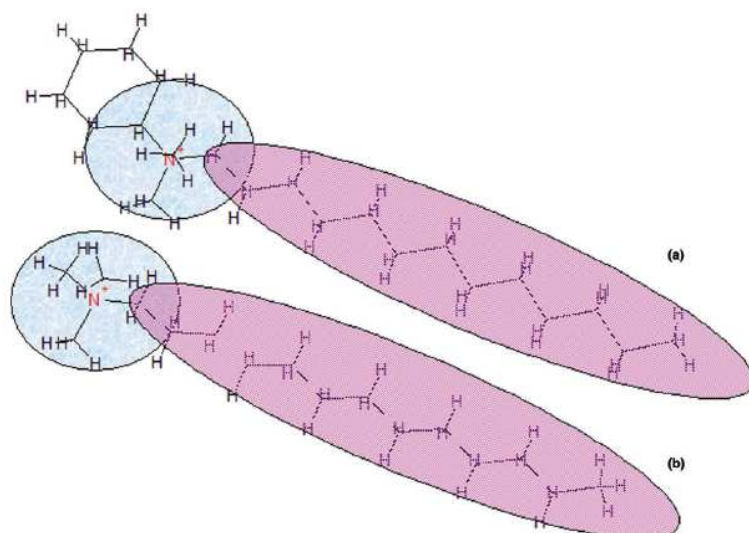


Figure 24 : Structure du (a) chlorure de tétradécyldiméthylbenzylammonium (un des éléments du mélange, en C14) ; (b) bromure de tétradécyltriméthylammonium (cétrimide), d'après [Gilbert & Moore, 2005]. Les contre-ions ne sont pas figurés. Les groupements cationiques sont entourés en bleu, les chaînes hydrophobes en rose.

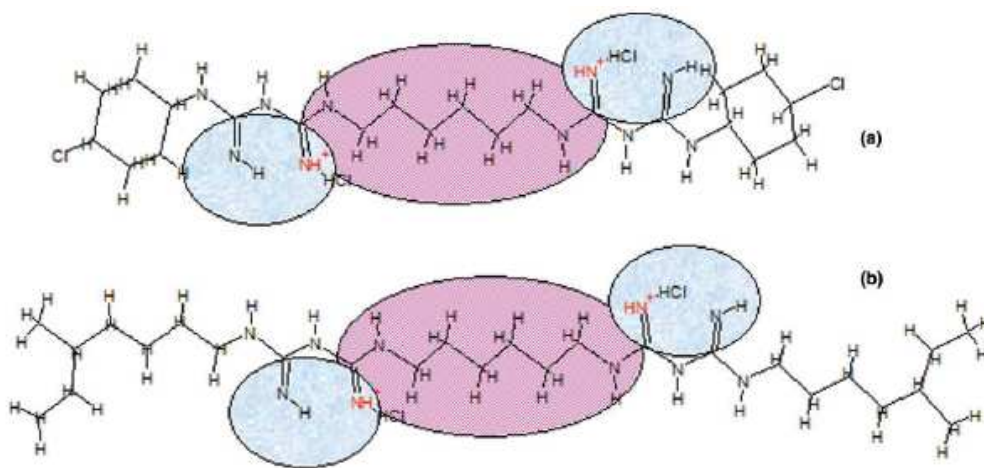


Figure 25 : Structure chimique de la chlorhexidine (a) et de l'alexidine (b), d'après [Gilbert & Moore, 2005]. Les contre-ions ne sont pas figurés. Les groupements cationiques sont entourés en bleu, les chaînes hydrophobes en rose.

Les composés les plus utilisés sont :

- (i) le cétrimide : mélange de bromures de *n*-alkyltriméthylammonium ($n = 8$ à 18 carbones), (CETAVLON[®]) (et que l'on retrouve aussi dans les milieux de culture gélosés sélectifs pour *P. aeruginosa*) ;
- (ii) les chlorures de benzalkonium : mélange de chlorures *n*-alkyldiméthylbenzylammonium (n = nombre spécifique et constant) (BISEPTINE[®]).

⊗ A noter : les ammoniums quaternaires sont incompatibles avec les savons et les composés anioniques. Ils sont inactivés en présence de fibres de cellulose ou de coton [Fleurette et al., 1995].

Récemment des monomères de sels d'ammoniums quaternaires ont été synthétisés et évalués sur différentes souches bactériennes associées à des infections buccales [Xiao et al., 2008].

TOXICITE

Même si ces composés sont très actifs, des données de la littérature suggèrent leur haut pouvoir toxique *in vitro* : sur cellules conjonctivales humaines (ATCC CCL-20.2) [Debbasch et al., 1999], cellules NHEK(F) (kératinocytes humains embryonnaires), NB1RGB (fibroblastes), JM (cellules de lymphome T), érythrocytes & BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines) [Nagamune et al., 2000 ; Deutsche et al., 2006]. Les bis-QACs ont une dose létale 50% (DL₅₀) inférieures au benzalkonium chloride, et les DL₅₀ restent très inférieures aux CMI : le rapport activité/toxicité reste bon [Nagamune et al., 2000].

2.1.2. Biguanides

2.1.2.1. Chlorhexidine & Alexidine

Les biguanides ont été synthétisé au début du 20^{ème} siècle, et ont donné naissance à des composés aux propriétés pharmacologiques variées (antipaludéen, antidiabétique, antiprotozoaire, antiseptique...) [Gilbert & Moore, 2005]. Les 1^{ères} molécules ont été synthétisées à partir de dérivés de l'acide para-aminobenzoïque ; 3 composés se sont détachés du lot, l'acide 3-hydroxy-, ou 3-chloro-4-aminobenzoïque, et l'acide 3-4-diaminobenzoïque. Une activité antibactérienne marquée a été obtenue au départ pour des mélanges de polyhexaméthylène biguanides, obtenus par réaction entre

de l'hexaméthylène bis-diacyanodiamide et l'hexaméthylène diamine [Gilbert & Moore, 2005]. Dans la série de molécules obtenues, une activité antibactérienne optimale a été obtenue pour le bisbiguanide : 1,6-bis(4'-chlorophenylbiguanide) hexane. Cette molécule a été appelée chlorhexidine (Figure 25). Elle a été commercialisée en France en 1972.

La chlorhexidine est probablement l'antiseptique le plus utilisé actuellement, en particulier dans les produits de lavage des mains, et les bains de bouche, mais aussi comme désinfectant des plaies, ou agent conservateur. Cela est dû à son spectre relativement large et à son pouvoir irritant faible au niveau cutané [McDonnell & Russel, 1999]. L'alexidine, quant à elle, est une molécule proche de la chlorhexidine, où les groupements éthylhexyl terminaux remplacent les groupements chlorophénol, avec une activité plus importante sur les bactéries responsables de la plaque dentaire.

☹ Les minéraux, l'eau dure et un pH>8 provoquent une précipitation de la chlorhexidine. Les protéines et les matières organiques diminuent l'activité [Fleurette et al., 1995].

TOXICITE

Caumes et coll., ont montré que les taux d'effets indésirables les plus élevés étaient trouvés avec l'hexamidine et l'association chlorhexidine-chlorure de benzalkonium [Caumes et al., 2006]. Dans une autre série de 4567 malades, ayant au moins un test cutané positif à l'allergène testé, les antiseptiques les plus souvent en cause sont la chlorhexidine (12^{ème} rang), l'hexamidine (16^{ème} rang) et le chlorure de benzalkonium (26^{ème} rang) [Goossens et al., 1997]. Plus récemment, dans un étude *in vitro*, Giannelli et coll., ont souligné l'importance de la toxicité de la chlorhexidine sur diverses lignées cellulaires (cellules ostéosarcome humain, fibroblastes murins, cellules d'endothéliome murin), et recommandé un usage raisonné de cet antiseptique en odontologie [Giannelli et al., 2008].

Raison de l'utilisation de cet antiseptique dans notre étude :

Cet antiseptique couramment utilisé en thérapeutique a été choisi pour sa structure bis-biguanide mais aussi pour son spectre d'activité, à la fois orienté Gram – et Gram +. Aucun antibiotique, à notre connaissance, ne porte de fonction guanidinium. La chlorhexidine, en tant que bisbiguanide et antiseptique cationique nous est apparu en conséquence comme un bon comparateur.

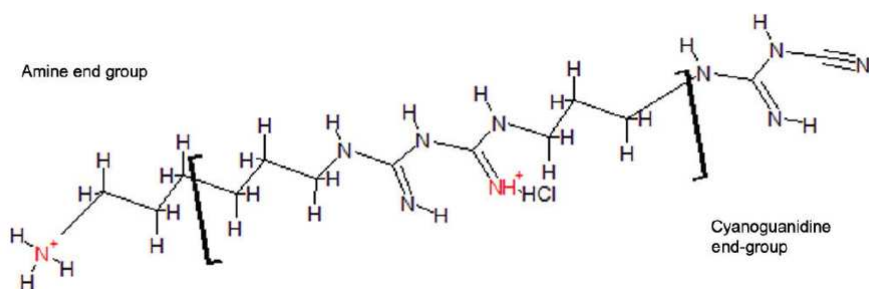


Figure 26 : Structure générale des PHMB, d'après [Gilbert & Moore, 2005].

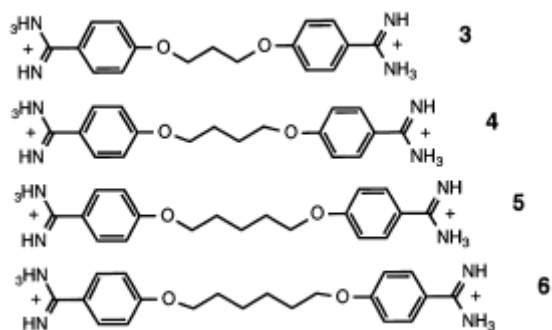


Figure 27 : Structures de propamidine (3), butamidine (4), pentamidine (5) et hexamidine (6).

2.1.2.2. Polyhexaméthylène biguanides (PHMB)

Par comparaison aux autres antiseptiques, les PHMB sont reconnus comme ceux ayant l'activité antibactérienne la plus intéressante, mais pâtissent d'une définition chimique médiocre (Figure 26). De nombreux essais ont été réalisés afin de mieux rationaliser la composition de ces produits, mais se sont avérés infructueux, limitant leur usage pharmaceutique. Cependant, les PHMB ont été commercialisés comme agents antibactériens à large spectre dans diverses applications telles que les désinfectants de piscine (BAQUACIL™), ou agents conservateurs pour les PVC (VANQUISH™). Malgré de grandes similarités d'action et de spectre avec les biguanides, les PHMB possèdent d'autres propriétés, les rendant plus aptes à un usage en tant que désinfectant-décontaminant : moindre toxicité, absence de couleur, d'odeur ou de goût [Gilbert & Moore, 2005].

2.1.3. Diamidines aromatiques

Les diamidines aromatiques (Figure 27), comme la pentamidine, ont été beaucoup étudiées depuis les années 1930, depuis qu'une activité significative a été découverte sur les trypanosomes [Soeiro et al., 2005]. Les 1^{ères} publications faisant état d'une activité antibactérienne des diamidines datent des années 40 [Kohn & Cross, 1948 ; Rieth, 1962]. Depuis, de nombreuses études ont montré l'activité intéressante des diamidines sur différents pathogènes, tels que des bactéries, des fungi ou des protozoaires. La **propamidine** est utilisée pour le traitement des kératites à *Acanthamoeba*, et d'autres infections de la cornée [Varga et al., 1993 ; Perrine et al., 1995]. La **pentamidine** est active sur *Pneumocystis jiroveci*, pathogène opportuniste responsable de pneumopathie chez le patient sidéen [Montgomery et al., 1987]. La pentamidine et ses analogues ont par ailleurs montré une action significative sur divers parasites tels que *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum* ou *Leishmania* spp. [Bell et al., 1991]. L'**hexamidine** est, quant à elle, un antiseptique très utilisé, aux applications variées : infections cutanées, acné, infections amibiennes de la cornée... Certains auteurs ont cependant montré une efficacité moindre de l'hexamidine par comparaison à la chlorhexidine, et en particulier une perturbation de la flore cutanée plus durable (retour à la composition initiale dans un délai plus long) [Michel et al., 1986]. D'autres ont démontré, au contraire, un respect de la flore cutanée [Chevalier & Crémieux, 1992]. Les données sont contradictoires, sans qu'une réelle étude de la toxicité des diamidines aromatiques n'ait été menée.

Cependant, malgré leur activité anti-infectieuse bien connue, les diamidines se caractérisent par des effets indésirables notoires (cardiotoxicité, néphrotoxicité, complications pancréatiques), et souffrent d'une faible biodisponibilité par voie orale, qui rend leur usage limité [Werbovetz, 2006]. De nouveaux composés ont alors été synthétisés afin de trouver un meilleur compromis entre efficacité et toxicité. Récemment, des dérivés diarylthiophène diamidines ont montré une activité intéressante sur *Trypanosoma cruzi* [da Silva et al., 2008]. Aucune recherche n'est par contre actuellement menée, à notre connaissance, sur des dérivés de l'hexamidine, à visée antibactérienne.

TOXICITE

Des cas de dermatoses de contact, de photosensibilité ou d'allergie systémique ont déjà été décrits [Mullins, 2006]. Une étude récente a montré sur un panel de 200 volontaires une absence d'irritation, d'inflammation ou de sensibilisation, après contact cutané avec une solution d'hexamidine à 0,1%. Un cas de photosensibilisation et un cas d'allergie ont été rapportés.

Raison de l'utilisation de cet antiseptique dans notre étude :

Cet antiseptique couramment utilisé en thérapeutique a été choisi pour sa structure diamidine (proximité de groupements fonctionnels avec le Cx1). Aucun antibiotique, à notre connaissance, ne porte de fonction guanidinium. L'hexamidine, en tant que diamidine, et antiseptique cationique nous est apparu en conséquence comme un bon comparateur.

2.2. Mécanismes d'action

L'activité antibactérienne des antiseptiques est aujourd'hui bien appréhendée, même si l'activité sur les isolats cliniques multi-résistants aux antibiotiques (BMR, Bactéries MultiRésistantes), reste encore trop peu évaluée. Du fait de l'émergence d'une résistance aux antiseptiques, et d'une possible résistance croisée antiseptiques/antibiotiques, il est nécessaire, à l'heure actuelle, de mieux comprendre le mécanisme d'action des antiseptiques, afin d'optimiser les nouveaux composés, en terme d'efficacité et de non susceptibilité aux mécanismes de résistance identifiés actuellement, ainsi que pour prévenir la dissémination des résistances

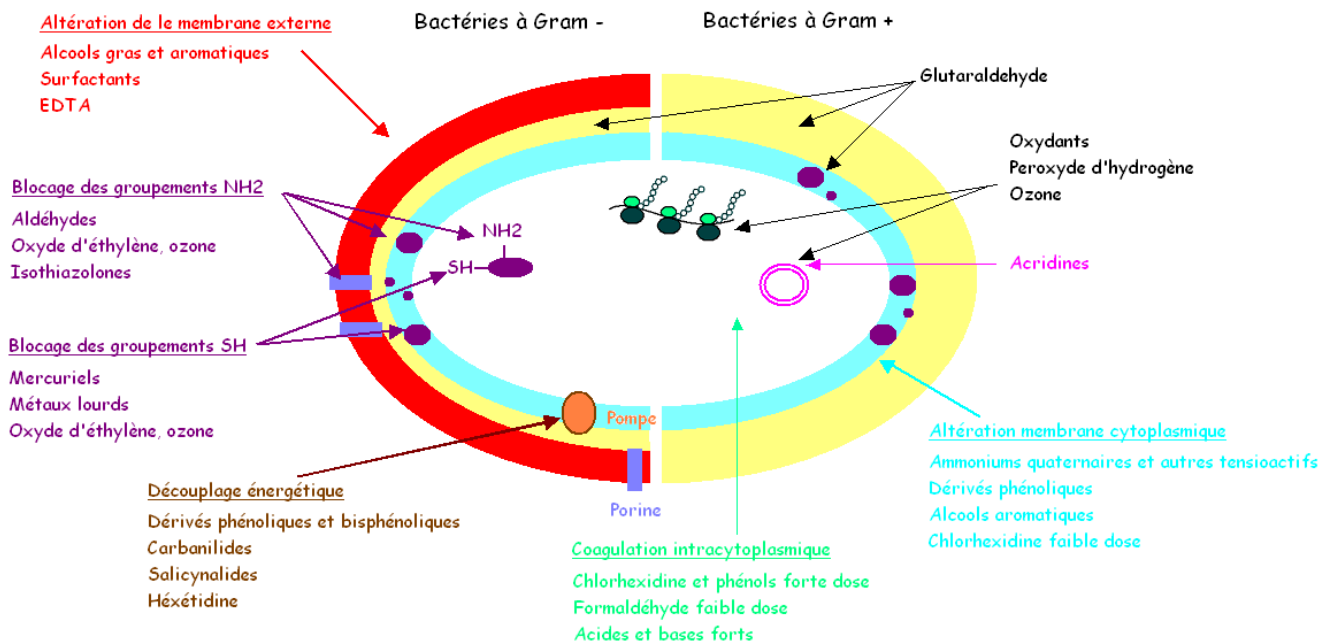


Figure 28 : Principaux modes d'action des antiseptiques sur les bactéries à Gram – et à Gram + (d'après [Fleurette et al., 1995]).

Les antiseptiques sont actifs sur une multitude de microorganismes, mais l'activité peut être très variable d'une souche à l'autre au sein d'une même espèce. La classification de Favero & Bond est une aide précieuse pour le choix de la molécule appropriée, mais ne permet pas d'appréhender la façon dont les microorganismes réagissent [Maillard, 2002]. Parmi les formes végétatives bactériennes, les Mycobactéries sont les plus résistantes, suivies par les bactéries à G-, les bactéries à G+ étant les plus sensibles. Ce défaut de pénétration des antiseptiques est à mettre en relation avec la composition et la structure de la paroi des bactéries, et non pas avec une différence de cibles membranaires. La structure de base et la composition du cytoplasme et de la membrane cytoplasmique sont bien conservées entre les différentes espèces bactériennes, même s'il existe quelques petites différences. En terme de sensibilité aux antibiotiques et aux antiseptiques, la structure et la composition de la membrane externe est intéressante puisqu'elles diffèrent de façon importante entre les genres. Il est accepté par la communauté scientifique que la membrane externe est responsable des réponses variables aux antibiotiques et aux antiseptiques. Par exemple, la membrane externe des bactéries à G-, et la paroi des Mycobactéries jouent un rôle de barrière imperméable et sont responsables des résistances naturelles des bactéries aux composés antibactériens. La structure de la paroi, 1^{ère} interface entre les bactéries et les molécules, est donc de 1^{ère} importance pour la compréhension de l'efficacité et du mécanisme d'action des composés antibactériens [Maillard, 2002]. Nous en discuterons plus loin, à propos des molécules étudiées dans ce travail.

Il est généralement admis que, contrairement aux antibiotiques, les antiseptiques ont plusieurs cibles thérapeutiques, et que la conjugaison de l'ensemble de ces actions entraîne un effet bactéricide (Figure 28). Les effets bactériostatiques, généralement obtenus pour de faibles concentrations, peuvent correspondre à une activité réversible sur la membrane cytoplasmique ou à l'atteinte d'une activité enzymatique. L'essentiel de la recherche sur les mécanismes d'action a été mené dans les années 60 et 70, et a fait l'objet de très peu de publications et de nombreuses inconnues demeurent. Des termes génériques tels que « agents agissant sur la membrane » ou « détergents biologiques » ont longtemps été utilisés, soulignant le manque de spécificité d'action de ces composés. L'analyse de la littérature suggère que les ammoniums mono-quaternaires (QAC, cétrimide CETAVLON[®], chlorure de benzalkonium), les ammoniums bi-quaternaires et les bis biguanides (chlorhexidine, BISEPTINE[®]), et les biguanides polymériques (VANTOCIL[®], COSMOCIL[®]) présentent de nombreuses similarités d'action, les différences essentielles résidant dans la nature de

leurs interactions avec la paroi bactérienne [Gilbert & Moore, 2005]. Diverses revues ont entrepris de mieux expliciter ces points communs et différences, c'est ce que nous allons étudier dans ce chapitre.

2.2.1. Principe général de l'interaction avec les bactéries

La surface de la paroi bactérienne possède une charge globale négative, stabilisée par la présence de cations divalents tels que Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Cette charge est portée par les acides teichoïques et les chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane chez les bactéries à Gram+, et par le lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries à Gram-, ainsi que par la membrane cytoplasmique [Maillard, 2002]. Cela est donc très peu surprenant que de nombreux composés antibactériens soient des dérivés cationiques, ayant une forte affinité pour la surface bactérienne. La création de telles interactions requière uniquement une forte charge positive, ainsi qu'une région hydrophobe, permettant à la fois l'attachement à la surface bactérienne et l'intégration dans la membrane cytoplasmique (et/ou membrane externe chez les bactéries à Gram-). **Les effets de telles interactions peuvent aller d'une simple altération de la paroi, entraînant une perturbation de la croissance, à une lyse cellulaire** ; le degré d'atteinte dépendant pour la plupart des composés de la concentration utilisée [Maillard, 2002].

2.2.2. Ammoniums quaternaires

Le mode d'action supposé des QAC mettrait en jeu une perturbation générale de la bicouche phospholipidique de la membrane plasmique (et de la membrane externe des bactéries à Gram -), et un relargage progressif des constituants intracellulaires. A de faibles concentrations, les QAC se lieraient aux groupements anioniques de la membrane, entraînant la perte de la capacité de régulation de la pression osmotique et le relargage des ions K^+ et H^+ [Gilbert & Moore, 2005]. A des concentrations moyennes, ils perturbent certaines fonctions physiologiques de la membrane telles que la respiration, le transport de solutés, ou la biosynthèse de la paroi. Aux fortes concentrations généralement utilisées dans les produits commerciaux, la lyse des bactéries est obtenue par solubilisation des membranes et relargage du contenu cellulaire.

Si l'on observe les interactions à un niveau moléculaire, l'action des QAC relève d'une interaction entre les groupements NH_2 chargés positivement et les têtes phospholipidiques (Figure 29). La chaîne

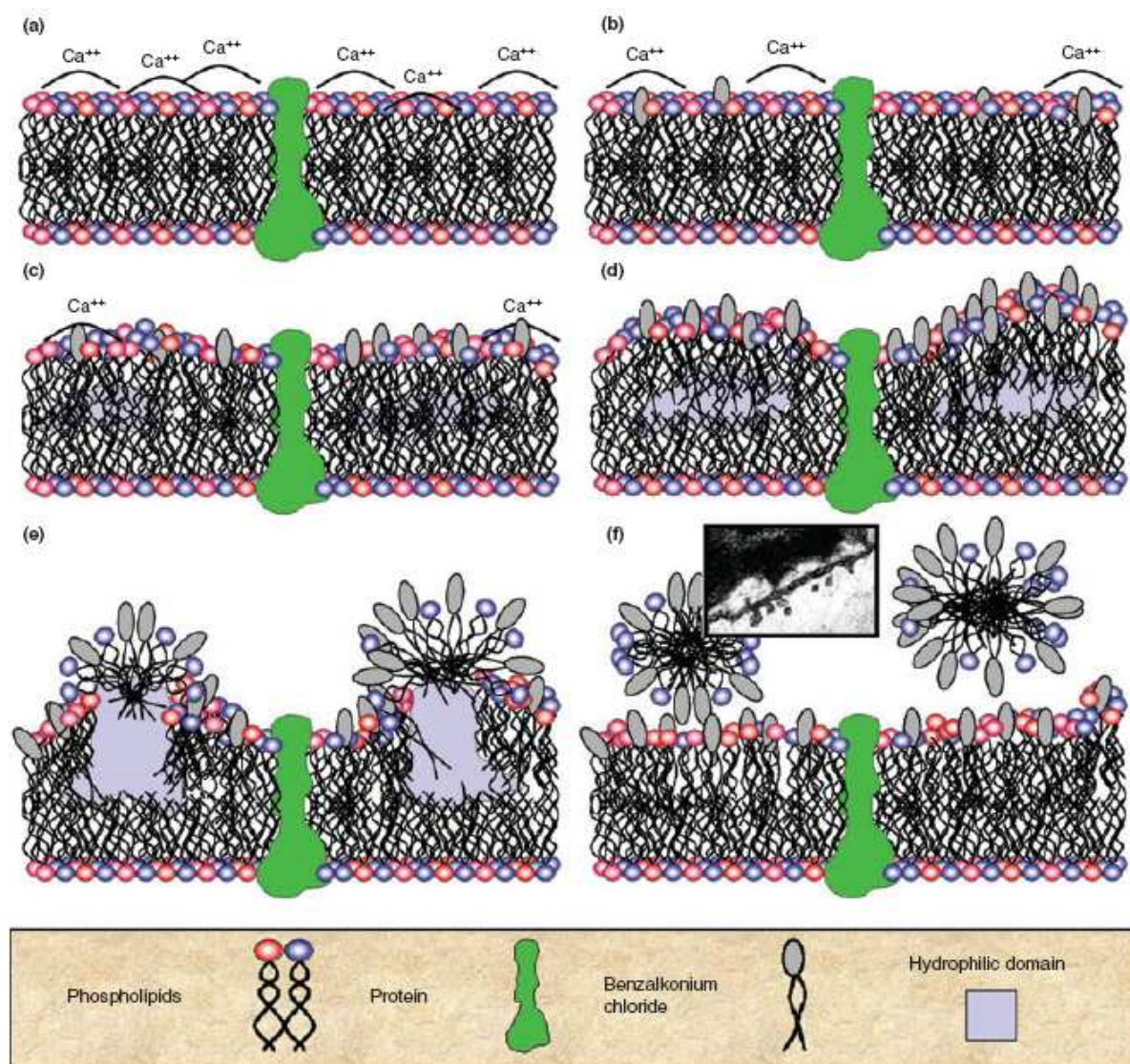


Figure 29 : Schéma représentant les différentes étapes de l'interaction entre les ammoniums quaternaires et les membranes bactériennes.

Les étapes a à f montrent l'adsorption progressive de la tête cationique avec les phospholipides, fonction de l'augmentation de la concentration en QAC. Cela entraîne une diminution de la fluidité et la création de domaines hydrophiles dans la membrane (d'après [Gilbert & Moore, 2005]).

hydrophobe s'inclut ensuite au sein de la bicouche hydrophobe. A la concentration minimale inhibitrice (CMI), ces interactions augmentent la pression de surface, diminuent la fluidité membranaire et la température de transition de phase. La membrane subit alors une transformation de l'état fluide à un état liquide cristallin, ce qui aboutit à une perte de ses fonctions physiologiques. L'hydrophobicité de la membrane diminue, et les phospholipides se réorganisent en arrangements hexagonaux stables. Aux concentrations usuelles, les QAC forment des agrégats micellaires qui solubilisent les composants hydrophobes de la membrane (lipide A, phospholipides...) (Figure 29) [Gilbert & Moore, 2005].

L'activité des ammoniums quaternaires est fonction de leur lipophilie, c'est-à-dire de la longueur de la chaîne alkyl. Pour les bactéries à Gram + et les champignons, l'activité est maximale pour une chaîne de 12 à 14 carbones ; pour les bactéries à Gram -, cette activité optimale est obtenue pour $n = 14-16$. Les composés avec $n < 4$ et $n > 18$ sont inactifs [Gilbert & Moore, 2005]. A partir de $n = 10$ carbones, l'activité antibactérienne augmente : l'attraction entre les chaînes hydrophobes adjacentes est supérieure à la répulsion entre les têtes nitrogène chargées. Les dimères formés interagissent plus fortement avec les membranes, que les monomères, et ont un pouvoir de solubilisation supérieur [Daoud et al., 1983]. Sur les biofilms, l'activité est fortement diminuée, et maximale pour une chaîne à 12 C pour *P. aeruginosa* et *S. aureus* (augmentation de l'hydrophilie des bactéries lorsqu'elles sont associées dans un biofilm) [Campanac et al., 2002].

2.2.3. Biguanides

2.2.3.1. Chlorhexidine et Alexidine

Les travaux initiaux sur le mécanisme d'action de la chlorhexidine ont été mené par Hugo & Longworth, dans les années 60. Cette équipe avait montré que l'action de la chlorhexidine sur *E. coli* et *S. aureus* était très rapide, dépendant à la fois de la concentration en chlorhexidine (CHX) et du pH. Les dommages au niveau de la paroi sont visibles, mais insuffisants pour entraîner la lyse et la mort cellulaire. La CHX passe ensuite au niveau cytoplasmique, probablement par diffusion passive, et attaque les protéines et les composants intracellulaires, ce qui s'accompagne de la mort cellulaire [Gilbert & Moore, 2005].

Les bisbiguanides ont un mécanisme d'action similaire aux QAC : les groupements biguanides se lient de façon covalente aux sites anioniques de la paroi, en particulier au niveau des phospholipides et

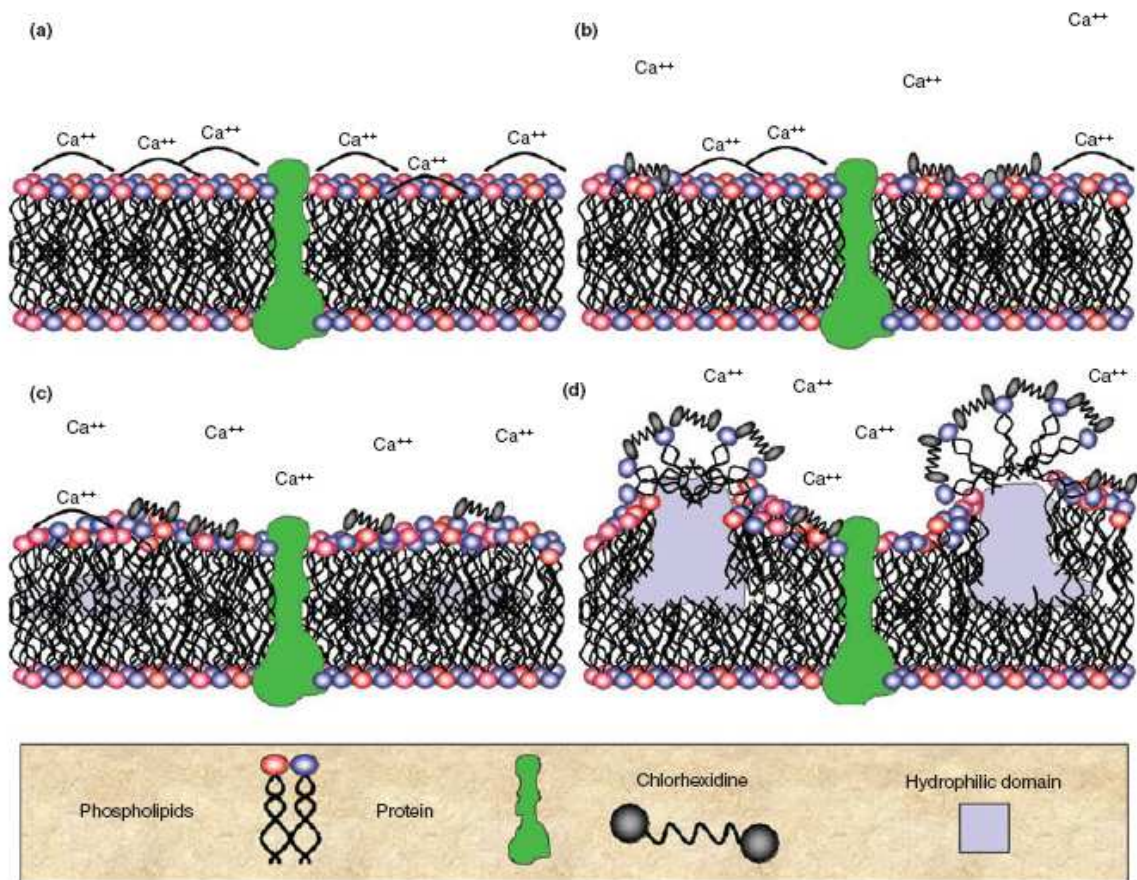


Figure 30 : Représentation schématique de l'interaction de la chlorhexidine avec la membrane bactérienne. Sont représentées les différentes étapes conduisant à la diminution de la fluidité membranaire, en fonction de l'exposition au bisbiguanide (d'après [Gilbert & Moore, 2005]).

des protéines. Cette liaison est plus forte que celle créée avec les QAC, et peut entraîner des déplacements de cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Une des différences majeures entre les biguanides et les QAC est la capacité des chaînes hydrophobes des QAC à solubiliser la membrane, capacité que ne possèdent pas les biguanides. Les chaînes alkyl sont moins longues (6 carbones en moyenne, contre 12 à 16 pour les QAC), et par conséquent, non flexibles, et incapable de s'intégrer dans la bicouche phospholipidique. La chlorhexidine agirait plutôt par formation de ponts entre les paires de phospholipides adjacents, chacune des têtes se liant à un groupement biguanide, déplaçant ainsi les cations divalents (Figure 30) [Gilbert & Moore, 2005].

Il est intéressant de constater que la distance entre deux têtes phospholipidiques est exactement équivalente à la longueur de la structure hexaméthylène. Cela expliquerait la réduction importante d'activité des bisbiguanides lorsque la chaîne est inférieure ou supérieure à 6 carbones. De telles interactions conduisent à une diminution de la fluidité membranaire à faible concentration, ce qui affecte l'osmorégulation, et les fonctions métaboliques de la membrane. Des effets tels qu'un relargage du contenu cellulaire, et une inhibition de la respiration et du transport de solutés ont été rapportés. A concentration plus élevée (concentrations usuelles), les interactions sont plus importantes : la membrane passe à un état liquide cristallin, avec perte de son intégrité structurale, et perte irréparable de matériel cellulaire [Gilbert & Moore, 2005].

2.2.3.2. Polyhexaméthylène biguanides (PHMB)

Lorsque l'on considère des mélanges purifiés, avec respect d'une longueur de chaîne donnée, il a été observé que l'activité antibactérienne augmente de façon significative avec la longueur de la chaîne, contrairement aux biguanides, dont l'activité diminue au delà de $n = 6$. Les dérivés se terminant par une amine, correspondant aux biguanides mais bien moins actifs, sont beaucoup plus efficaces au delà de $n = 10$ [Gilbert & Moore, 2005]. Cela semble similaire à ce qui a été observé, par exemple, avec les QACs.

Figure 31 sont représentées les interactions entre les PHMB et la paroi bactérienne. Comme les bisbiguanides, les PHMB se lient rapidement à la paroi des bactéries (au niveau du LPS, du peptidoglycane et de la membrane cytoplasmique), entraînant un déplacement des ions Ca^{2+} , et donc une déstabilisation de la paroi [Broxton et al., 1984a ; 1984b]. Les groupements hexaméthylène sont hydrophobes, mais insuffisamment flexibles pour permettre une insertion dans la membrane,

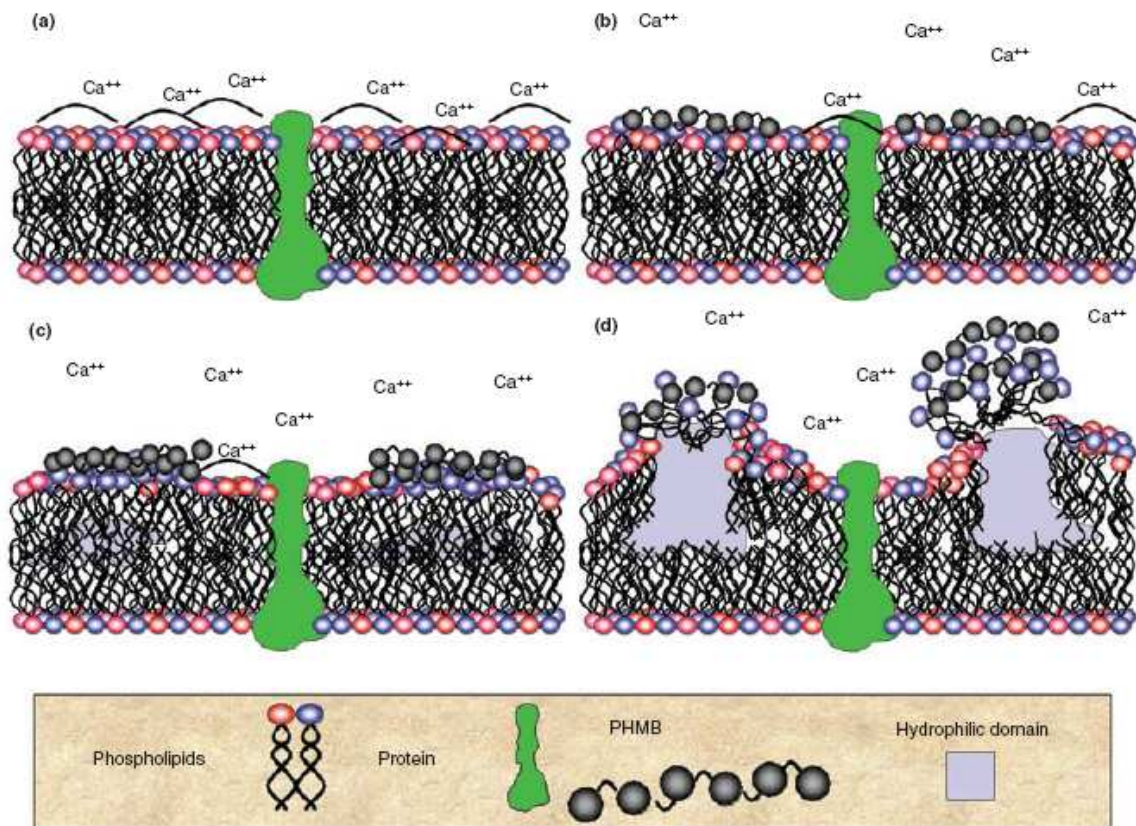


Figure 31 : Représentation schématique de l'interaction des PHMB avec la membrane bactérienne. Sont représentées les différentes étapes conduisant à la diminution de la fluidité membranaire, et à la formation de domaines phospholipidiques individuels. Cela aboutit à la formation de domaines hexagonaux, car plus stables, et à une dissolution de la membrane (d'après [Gilbert et al., 2005]).

contrairement à ce qui peut être obtenu avec les QACs. De même que pour les bisbiguanides, les interactions mettent en jeu la formation de ponts entre les têtes phospholipidiques. Les PHMB se concentrent au niveau de sites membranaires où la densité de charge est maximale (sites protéiques). Cela entraîne une perte de fonction de ces protéines, par modification de l'environnement phospholipidique et de la charge globale : perte des fonctions de transport, de biosynthèse et de métabolisme (comparable à ce qui est obtenu en présence de chlorhexidine) [Gilbert & Moore, 2005]. Broxton et coll., ont de plus montré une fixation préférentielle sur le phosphatidylglycérol et le diphosphatidylglycérol, plutôt que sur la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine [Broxton et al., 1984c].

Cependant, par comparaison aux bisbiguanides dont la structure est parfaitement définie, la nature polymérique variable des PHMB permet la création d'interactions pas seulement entre deux têtes phospholipidiques adjacentes. Plutôt qu'une adsorption sur la membrane au niveau des sites anioniques, les PHMB séquestrent les phospholipides avec formation de domaines [Broxton et al., 1984c]. La distribution normalement homogène des phospholipides, associés à des protéines, association aux fonctions biologiques parfaitement définies, se transforme en une mosaïque de domaines individuels. Chacun de ces domaines a des propriétés de transition de phase différentes, fragmentant la membrane en domaines fluides ou liquides cristallins. Cela aboutit à un relargage du contenu cellulaire, par augmentation de la perméabilité membranaire [Gilbert & Moore, 2005]. La capacité des PHMB à créer des domaines phospholipides est fonction de la longueur de la chaîne alkyl : plus elle est longue, plus les domaines formés peuvent être importants, et plus efficace est la déstabilisation membranaire [Ikeda, 1991].

2.2.4. Diamidines aromatiques

Des travaux ont montré que l'activité de ces dérivés bis(amidinophenoxy)alkanes, serait due à une interaction directe avec le génome des microorganismes [Shapiro & Englund, 1990]. Des changements morphologiques ont été rapportés au niveau des sites contenant l'ADN extranucléaire chez les protozoaires traités avec la pentamidine [Sands et al., 1985]. Il a été montré plus tard, que la pentamidine est capable de se fixer au niveau des boucles mineures de l'ADN, avec une préférence pour les zones riches en A-T [Bailly et al., 1997].

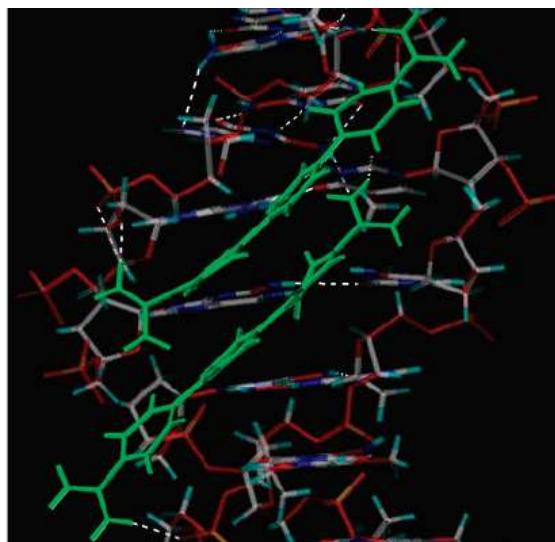
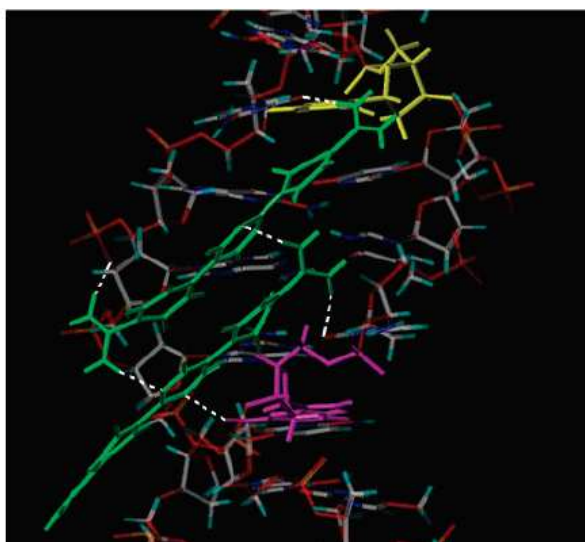
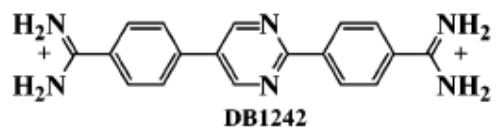
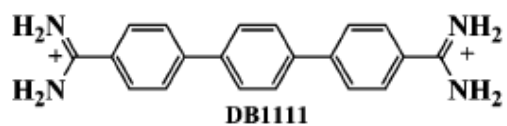


Figure 32 : Exemple de diamidines interagissant avec les séquences riches en GC de l'ADN, d'après [Munde et al., 2006]. Les liaisons hydrogène potentielles sont figurées en blanc.

Des études ont montré le lien entre la longueur de la chaîne alkyl centrale et l'efficacité anti-amibienne. Les trois composés les plus actifs sont la propamidine, l'hexamidine, et la pentamidine [Perrine et al., 1995]. Fort de ce constat, une équipe a étudiée l'influence de la longueur de la chaîne alkyl sur la fixation à l'ADN. Ils ont ainsi montré que la propamidine, la pentamidine, et à un degré moindre, l'hexamidine, sont capables de se lier spécifiquement à certaines séquences d'ADN, contenant au moins 4 répétitions A-T consécutives. La fixation de la butamidine, de l'heptamidine, de l'octamidine et de la nonamidine n'est que peu sélective. Ces auteurs ont par ailleurs démontré l'importance de la conformation en double hélice, qui joue un rôle déterminant dans la fixation des diamidines [Bailly et al., 1997]. Ces constatations indiquent que la fixation sur les séquences A-T doit jouer un rôle dans l'activité biologique des diamidines, mais aucune corrélation simple ne semble exister entre liaison à l'ADN et efficacité pharmacologique.

Récemment, une équipe a montré que certains composés de type diamidine (très différents cependant de l'hexamidine, en terme de structure) étaient capables d'interagir avec l'ADN au niveau de zones riches en G-C (Figure 32) [Munde et al., 2007].

III. Composés cationiques antibactériens : quoi de neuf ?

Dans ce contexte, une approche attractive est le développement d'agents antibactériens ciblant la membrane des bactéries à Gram -, ou la paroi (peptidoglycane) des bactéries à Gram +. En effet, ces structures constituent une cible idéale dans la mesure où elles sont hautement conservées d'une espèce à une autre. Développer une résistance vis-à-vis de molécules agissant au niveau pariétal nécessite des changements majeurs au niveau de la structure même de la bactérie, ce qui peut modifier la perméabilité membranaire, et ainsi entraîner une modification de l'apport de nutriments (mutant métaboliquement non compétitif), ou même une sensibilité accrue à certains autres antibiotiques. L'équilibre est plus difficile à maintenir pour la bactérie, et l'adaptation plus lente à se mettre en place (tout en moins en théorie, ce qui nous laisse espérer avoir une longueur d'avance !).

3.1. Peptides antimicrobiens

3.1.1. Structure

Les peptides antimicrobiens sont des composants clés des systèmes de la défense immunitaire innée, non adaptative, des organismes pluricellulaires, animaux et végétaux [Hancock, 1999 ; Hoffmann et al., 1999 ; Ganz & Lehrer, 1999]. Il s'agit d'un ensemble de petites protéines, comportant 20 à 50 acides aminés, uniquement de type L, qui partagent un **caractère cationique** et des **propriétés amphiphiles**. Ce sont donc des molécules naturelles, possédant de par leur nature, des fonctions antibactériennes, antifongiques, voire antivirales. L'expression des gènes codant ces peptides est constitutive ou induite en réponse à une infection. Dans la plupart des cas, l'expression des peptides antimicrobiens est locale : cellules phagocytaires, épithélium ou graines, racines, feuilles chez les plantes. Les peptides cationiques antimicrobiens présentent une grande diversité structurale, et la classification compte habituellement 3 grandes familles (Figure 33) [Andres & Dimarcq, 2006]:

1) les peptides linéaires formant des hélices

Les cécropines et les magainines sont les prototypes des **peptides très fortement cationiques**, formant des hélices α . Les cécropines furent les 1^{ers} peptides antimicrobiens cationiques entièrement caractérisés, à partir des nymphes du papillon *Hyalophora cecropia*, au début des années 80.

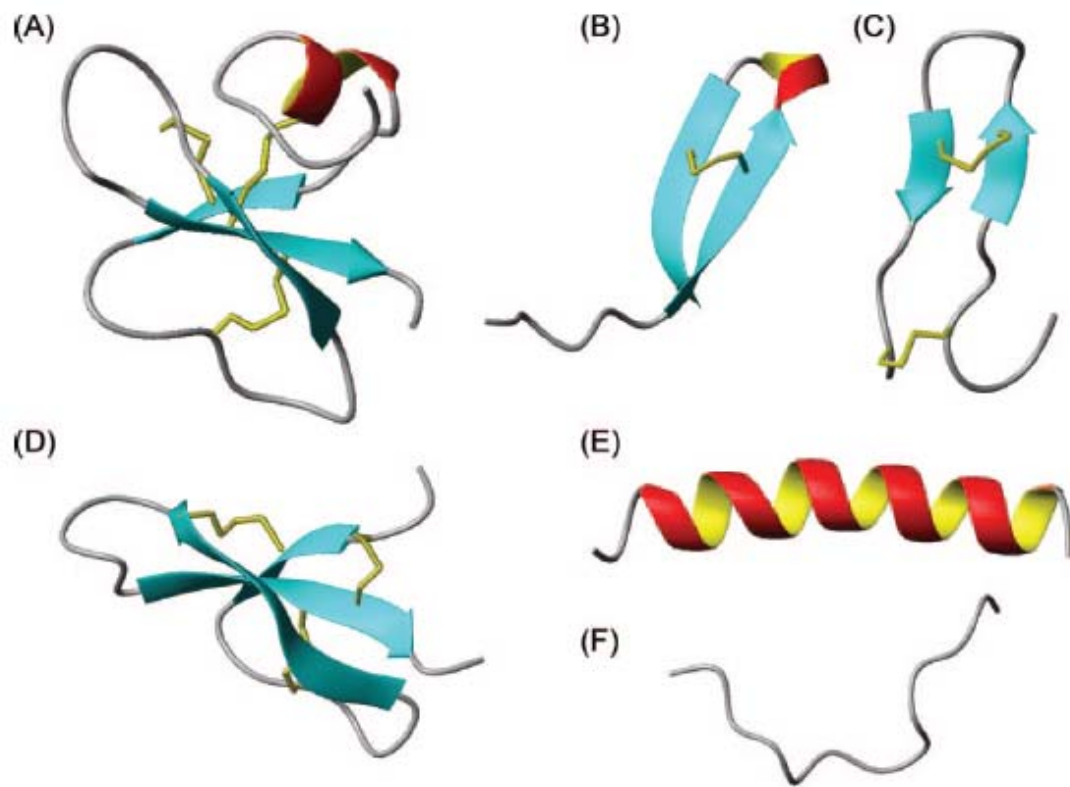


Figure 33 : Exemple de structure de peptides cationiques, d'après [Jenssen et al., 2006].

A : β -défensine-2 humaine ; B : thanatine ; C : polyphemusine ; D : défensine-1 (rein de lapin) ; E : magainine ; F : indolicidine.

2) les peptides possédant un ou plusieurs ponts disulfures

Ce groupe est quantitativement le plus important. Il est composé de peptides de 2 à 5 kDa, contenant 2 à 8 résidus cystéine engagés dans des ponts disulfures intramoléculaires. Dans cette famille figurent les défensines α et β de mammifères, celles des insectes et celles des plantes. Selon leur origine, les défensines ont des structures tridimensionnelles et des activités différentes :

- les défensines de mammifères sont formées de feuillets β antiparallèles stabilisés par 3 ponts disulfures ; elles sont principalement actives sur les bactéries à Gram + et à Gram -.
- les défensines d'insecte (3 ponts disulfures, anti-Gram +) et celles des plantes (4 ponts disulfures, antifongiques) partagent un même motif structural dont l'élément central est une hélice α reliée à un feuillet β antiparallèle par deux ponts disulfures.

On trouve aussi dans cette famille des peptides plus petits, dont la structure dans l'espace forme une épingle à cheveux. L'exemple est la protégrine I, produite par les leucocytes de porc, et qui présente des similitudes structurales avec des peptides antimicrobiens de limule.

3) les peptides contenant un pourcentage élevé d'un acide aminé autre que la lysine ou l'arginine. Cette famille très hétérogène rassemble des peptides dont la composition est dominée par un type d'acide aminé :

- histidine dans les histatines retrouvées dans la salive humaine,
- tryptophane dans les indolicidines isolées chez les bovins,
- proline et glycine dans de nombreux peptides d'insectes.

Certains peptides riches en proline ont la particularité d'être O-glycosylés, et il a été montré que ces substitutions étaient importantes pour l'activité ainsi que pour la stabilité dans les liquides biologiques [Bulet et al., 1999].

Quatre caractéristiques peuvent définir l'activité de ces peptides :

- (i) toxicité sélective vis-à-vis des cellules procaryotes (bactéries) du fait de l'affinité pour la membrane bactérienne chargée négativement ;
- (ii) activité bactéricide rapide (cible membranaire) ;

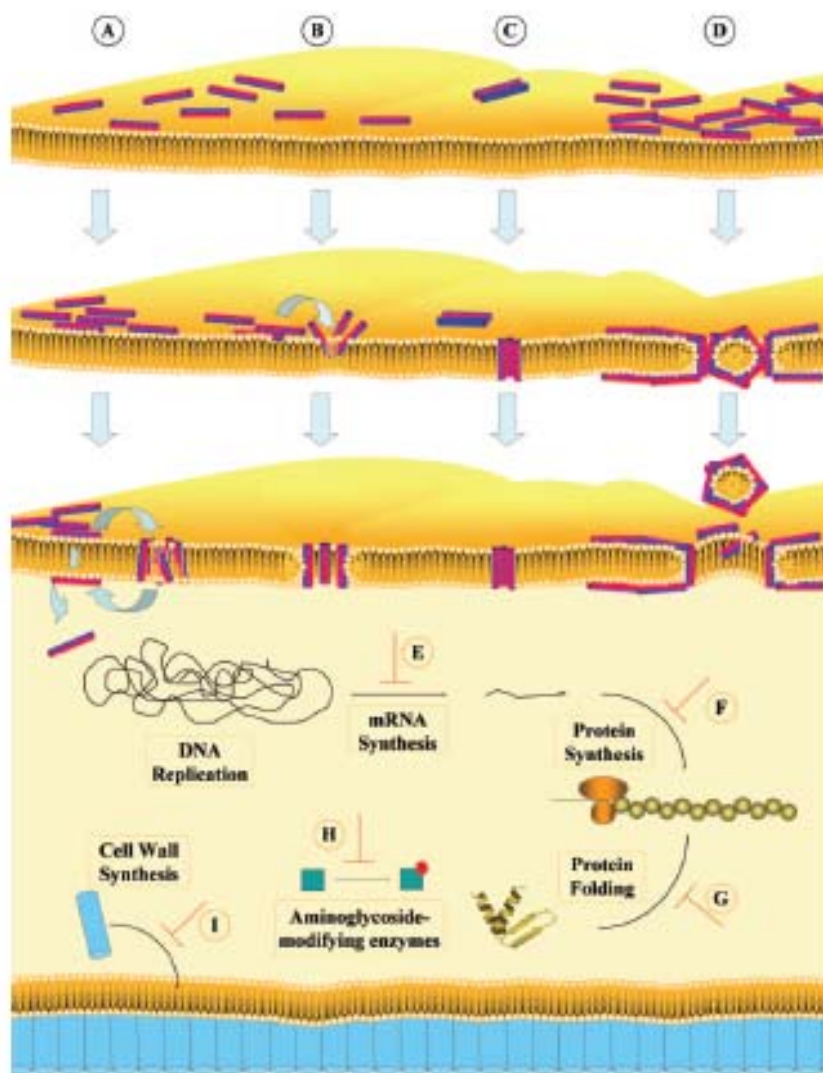


Figure 34 : Différents modes d'action proposés pour les peptides cationiques antibactériens. D'après [Jensen et al, 2006].

- (iii) activité à large spectre (cible commune aux bactéries à Gram + et à Gram -) ;
- (iv) absence d'induction de mutants résistants. En effet, pour développer une résistance vis-à-vis des peptides antibactériens, les bactéries doivent changer la structure de leur paroi, ce qui risque d'altérer sa fonction de barrière, d'augmenter la perméabilité et donc de favoriser l'activité d'autres antibiotiques.

Les principaux inconvénients de ces produits naturels est qu'ils sont difficile à synthétiser et donc à modifier pour en améliorer les propriétés ; et l'existence d'une activité hémolytique importante a longtemps freiné leur développement en clinique [Ding et al., 2002].

3.1.2. Mécanisme d'action

Le mode d'action des peptides antimicrobiens est surtout connu pour les peptides à hélices α comme les cécropines ou les magainines. Les peptides cationiques exerceraient leur activité bactéricide par perméabilisation de la membrane, par un effet de type détergent, avec parfois la formation de pores. Ce mécanisme d'action est très rapide, et indépendant de l'interaction avec une cible moléculaire unique. Il existe cependant une certaine spécificité d'action. Ainsi, la formation de pores par la magainine se fait préférentiellement dans les membranes riches en phospholipides anioniques comme celles des bactéries. En dépit de la diversité de la séquence en acides aminés, et de la structure (feuillet β , hélices α , boucles...) des peptides antimicrobiens, ils possèdent tous la même organisation en trois dimensions. Ce sont toutes des molécules amphiphiles, avec une face hydrophobe, et une face hydrophile chargée. Du fait de cet arrangement et de la composition de la paroi bactérienne, les peptides cationiques antibactériens agissent après interactions avec la bicouche phospholipidique des membranes. Un des modèles du mode d'action de ces composés est appelé le modèle Shai-Matsuzaki-Huang, présenté Figure 34. Les peptides sont habituellement non organisés en solution. Après interaction avec la membrane, ils adoptent une structure tri-dimensionnelle, de façon à ce que la molécule devienne amphiphile, avec la face chargée positivement interagissant avec les têtes phospholipidiques anioniques. Le peptide s'intègre ensuite au sein de la bicouche (cette insertion a été montrée par microscopie à force atomique, et diffraction des rayons X) ; il y a ensuite formation de canaux, mais si ce processus est encore mal compris. Ce phénomène dépend à la fois du peptide, et des propriétés de la paroi (phase, élasticité, longueur des chaînes hydrophobes, degré d'hydratation ...). La lyse bactérienne survient ensuite par différents

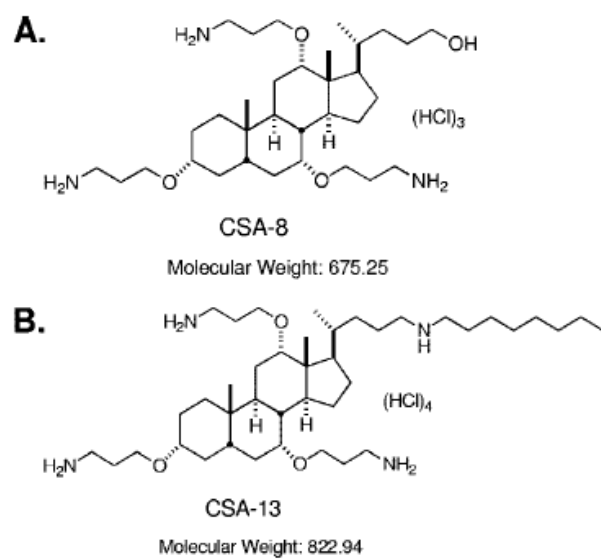


Figure 35 : Exemple de structure de céragénines.

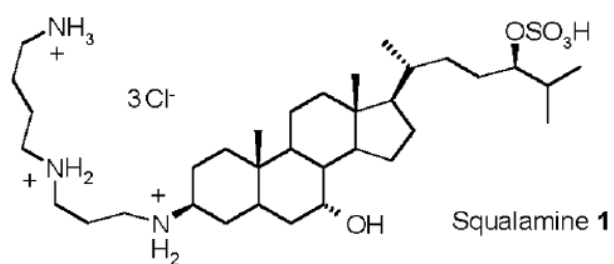


Figure 36 : Exemple de structure des dérivés cationiques à structure stéroïque.

mécanismes : (i) dépolarisation membranaire, (ii) interférence avec des processus intracellulaires, comme les différentes voies de synthèse métaboliques, (iii) modification de la composition lipidique de la membrane, et/ou, (iv) formation de micelles entraînant le relargage du contenu intracellulaire [Straus & Hancock, 2006].

Ces interactions fortes avec la paroi bactérienne, indispensables à l'activité des peptides antibactériens, a été confirmé par l'existence de mutations augmentant la sensibilité de certaines bactéries à leur action. Ainsi, Peschel et coll. ont montré qu'une inactivation de l'opéron *dlt* chez *S. aureus* entraîne une susceptibilité accrue à certaines défensines ; cela serait lié à une modification des interactions électrostatiques entre les défensines et la paroi. Les acides teichoïques de ces souches sont hautement chargés négativement, du fait de la présence de groupements phosphates déprotonisés, et par estérification des D-Alanine (diminution des charges positives) [Peschel et al., 1999]. L'expression native de cet opéron chez *S. aureus* le protège donc normalement contre l'action de ces peptides antibactériens.

3.2. De nouveaux composés ?

3.2.1. Dérivés cationiques à structure stéroïdique

Li et coll., ont préparé une série de dérivés de l'acide cholique avec des groupements aminés sur une des faces de la structure stéroïdique (Figure 35). Ces structures, nommées céragénines, ont une activité comparable à celle de certains peptides antibactériens : sélectivité pour les bactéries, activité bactéricide rapide, large spectre, propension faible à l'induction de mutants résistants [Li et al., 1999 ; Ding et al., 2002 ; Chin et al., 2007]. De plus, ces dérivés stéroïdiques sont plus faciles à synthétiser, à modifier par addition ou soustraction de fonctions, et à purifier ; leur utilisation est par conséquent plus aisée pour explorer à l'échelle moléculaire les interactions avec la paroi bactérienne. Par ailleurs, il a été montré que ces composés sont aptes à perméabiliser la membrane des bactéries à Gram -, et ainsi à favoriser l'entrée de certains antibiotiques (érythromycine, novobiocine, rifampicine) [Schmidt et al., 2001]. Ces composés pourraient par conséquent être des adjuvants intéressants, afin d'élargir la gamme d'antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram -, tout en permettant l'entrée d'antibiotiques hydrophobes normalement stoppés par la membrane externe.

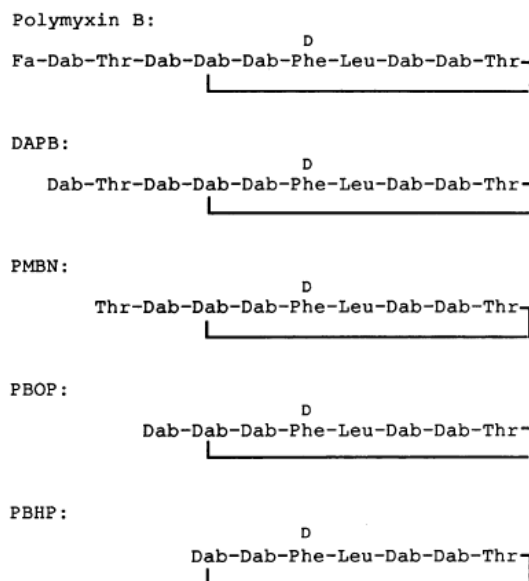


Figure 37 : Exemple de structure de dérivés obtenus à partir de la polymyxine (d'après [Vaara et al., 1992]). DAPB : deacylpolymyxin B ; PBOP: polymyxine B octapeptide ; PBHP : polymyxine B heptapeptide.

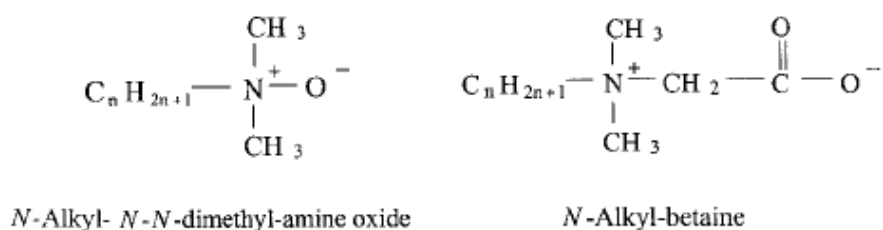


Figure 38 : Exemple de structure de dérivés alkyldiméthyl amine N-oxides & N-alkylbétaines (d'après [Birnie et al., 2000]).

Les composés stéroïdiques cationiques ont prouvé qu'ils possèdent des propriétés intéressantes de perméabilisation des membranes, leur procurant un pouvoir antibactérien certain (spectre large, à la fois sur les bactéries à G⁺ et -), mimant les propriétés de la polymyxine en particulier (Figure 36) [Salmi & Brunel, 2007]. Généralement, parmi ces composés ayant le même squelette stérol, **les composés avec les groupements guanidine semblent être les plus actifs**. Il apparaît clairement, nous en discuterons plus amplement dans la partie « calixarènes » que les fonctions guanidinium sont porteuses de fonctions biologiques variées.

3.2.2. Dérivés de la polymyxine

La colistine (polymyxine E) et la polymyxine B sont des lipodecapeptides cycliques comportants 5 fonctions amines libres, donc 5 charges positives. Leur cible est la membrane externe chez les bacilles à Gram -, par liaison des groupements NH₂ sur les groupements chargés négativement du LPS. Découverts en 1947, ils ont rapidement été mis de côté du fait de leur néphrotoxicité et de leur neurotoxicité importante. Des études ont alors été menées pour trouver des dérivés moins toxiques, et une nouvelle famille est née : les polymyxines nonapeptides [Vaara, 1992] : molécules à toxicité moindre mais... activité antibactérienne nulle ! Des propriétés très intéressantes de synergie avec les antibiotiques normalement exclus par la membrane externe (macrolides, vancomycine...) ont cependant été mises en évidence. Récemment, des dérivés de polymyxine B ne possédant que 3 charges positives ont montré une toxicité moindre et un pouvoir potentialisant intéressant d'autres antibiotiques (Figure 37) [Vaara et al., 2008].

3.2.3. Alkyldiméthyl amine N-oxides & N-alkylbétaines C10-C16

Ces composés font partie de la famille des surfactants (Figure 38). Leur activité anti-infectieuse a été mise en évidence sur *S. aureus* ou encore *Saccharomyces cerevisiae* [Glover et al., 1999]. Leur action impliquerait une interaction avec la membrane [Kopecka-Leitmanova et al., 1989]. De même que pour les composés précédemment cités, **l'activité augmente avec la longueur de la chaîne alkyl, jusqu'à un seuil à C14** [Birnie et al., 2000]. La longueur optimale varie selon la bactérie considérée : *S. aureus* (C15), *E. coli* (C12) [Devinsky et al., 1990]. Au delà de C14, un effet plateau est obtenu. Cette observation est similaire à celle déjà réalisée avec les QACs ou les PMHB ; cela

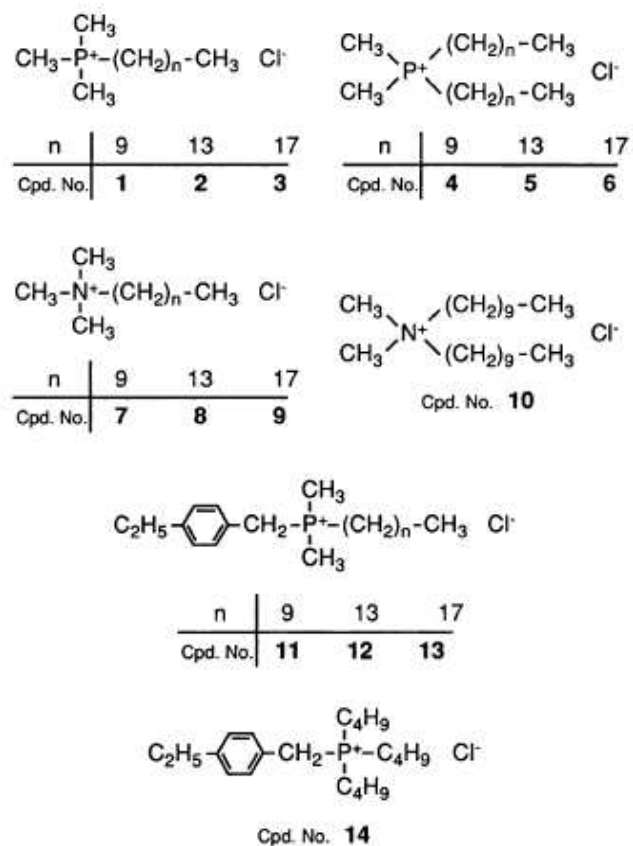


Figure 39 : Exemple de structure de sels de phosphonium di- et tri-méthylés (d'après [Kanazawa et al., 1994]).

semble indiquer un lien réel en terme de relations structure-activité, entre la longueur de la chaîne alkyl et l'activité antibactérienne, nous en discuterons au cours de ce travail.

Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour l'expliquer : (i) la concentration est insuffisante au niveau du site d'action pour avoir un effet sur la membrane (augmentation de la solubilité des lipides plus rapide que le changement de coefficient de partition liquide/fluide) ; (ii) formation de micelles d'où une diminution du pouvoir de diffusion de ces molécules et de leur capacité de perméation ; (iii) lorsque les chaînes atteignent une certaine longueur, elles mimeraient mieux les phospholipides membranaires, et auraient ainsi moins d'effet sur la membrane [Birnie et al., 2000]. L'activité antibactérienne augmente après ajout d'une chaîne oleyl : cela serait dû à une meilleure balance hydrophile/lipophile, plus apte à désorganiser la membrane.

3.2.4. Sels de phosphonium di- et tri-méthylés C10-C18

Les sels de phosphonium semblent être plus actifs que les sels d'ammonium [Kanazawa et al., 1993]. Ainsi, non seulement la longueur de la chaîne alkyl influence l'activité antibactérienne, mais la nature du ou des groupements cationiques, semble jouer elle-aussi un rôle clé ; nous avons exploré plus avant cette hypothèse, qui sera discuté dans la discussion générale.

Pour les composés mono-alkyls, la meilleure activité est obtenue pour le composé en C14. Pour les composés di-alkyls, l'activité bactéricide diminue au fur et à mesure de l'augmentation de la longueur de la chaîne, alors que l'inverse est observé pour les composés tri-méthyl-alkyl (Figure 39) [Kanazawa et al., 1994]. L'activité de ces composés sur *E. coli* est inférieure à celle obtenue pour *S. aureus*.

Pour les composés à longue chaîne alkyl, l'effet est plus important à faible concentration : cela est dû à la formation d'agrégats micellaires en solution aqueuse (on rejoint ainsi l'hypothèse formulée pour les composés précédemment cités). La concentration active dépend de la « Critical Micelle Concentration » (CMC), concentration au-delà de laquelle se forme les micelles. La nature des substituants joue aussi un rôle primordial. Ainsi, pour ces composés, lorsque l'on considère une même chaîne de 10 C, plus les substituants sont hydrophobes, plus l'activité est importante : les interactions avec la membrane sont meilleures. De façon surprenante, si l'on considère les chaînes en C14-C18, plus la structure est simple, plus l'activité est intéressante [Kanazawa et al., 1994].

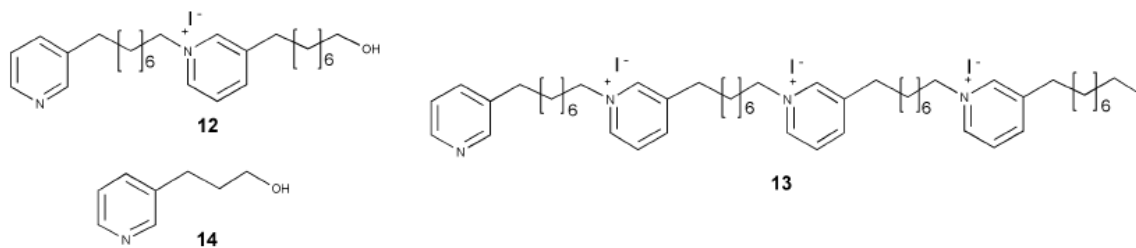


Figure 40 : Exemple de structure de sels d'alkylpyridinium (d'après [Mancini et al., 2004]).

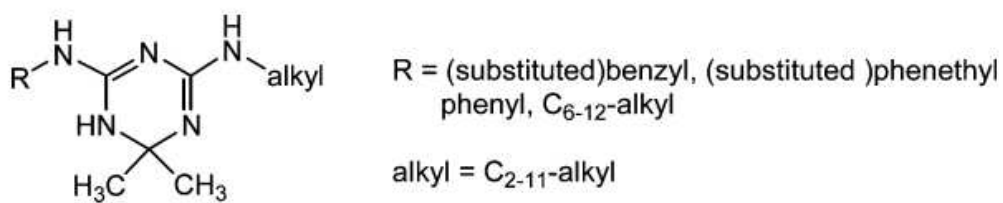


Figure 41 : Structure des dérivés 4,6-di(substitué)amino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine (d'après [Maeda et al., 2009]).

3.2.5. Sels alkylpyridinium

Mancini et coll. ont travaillé sur des sels 3-alkylpyridinium (Figure 40). Les composés les plus actifs étaient : monomère avec un brome, dimère (n=6) et tétramère (n=6). L'activité est bien plus importante sur les bactéries à Gram + que sur les Gram -, ce qui avait déjà été obtenu avec des alkylpyridines. L'activité augmente avec le nombre de charges positives, et donc avec le nombre de cycles pyridinium [Mancini et al., 2004]. Cependant, ces composés présentent une activité hémolytique marquée, limitant leur intérêt, et confirmant ce qui avait déjà été observé avec les cetylpyridinium bromides [Malovrh et al., 1999]. Le pouvoir hémolytique avait déjà été souligné comme le point faible d'un certain nombre de peptides antimicrobiens.

Chelossi et coll. ont confirmé l'importance d'une structure di- ou tétramérique : l'activité de ces composés est plus de 10 fois supérieure à celle des monomères. Cela s'expliquerait par une augmentation du nombre de charges positives et leur concentration sur une seule et même molécule (cela se rapproche de notre concept de pré-organisation de charges positives) [Chelossi et al., 2006]. Ils ont aussi confirmé l'importance primordiale de 3 éléments :

- la longueur de la chaîne alkyl ;
- la présence d'une partie chargée (groupement pyridinium) ;
- la présence d'un brome (effet antibactérien propre ?).

3.2.6. Dérivés 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine

Ces molécules sont des dérivés cycliques d'antiseptiques de type biguanide, comme la CHX (Figure 41). La synthèse de tels composés est réalisée depuis la découverte du cycloguanil en 1946, métabolite actif du biguanide antimalarial, proguanil. Ce type de composé agit par inhibition de la dihydrofolate réductase, et sont donc de potentiels agents antibactériens (le mécanisme se rapproche de celui du triméthoprim). L'hypothèse est qu'une balance idéale hydrophobicité/hydrophilie est nécessaire pour qu'un composé interagisse avec la paroi bactérienne : présence de 2 groupements aminés de part et d'autre d'une chaîne aryl/arylalkyl/alkyl. Maeda et coll., ont ainsi montré que certains de ces composés présentent des CMI comparables à la CHX, mais avec des CMB supérieures (molécules bactériostatiques) [Maeda et al., 2009]. L'activité est similaire quelque soit la nature des

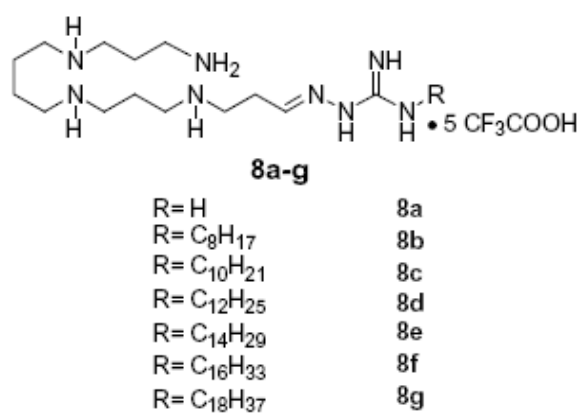


Figure 42 : Exemple de structure de lipopolyamines porteuses de gyanylhydrazones (d'après [Wu et al., 2008]).

substituants aminés et la longueur de la chaîne alkyl ; la longueur de la chaîne alkyl et la nature des substituants n'a donc pas toujours une influence...

3.2.7. Lipopolyamines porteuses de guanylhyazones

Les lipopolyamines ont été identifiées comme des molécules capables de bloquer l'action de certaines endotoxines bactériennes, en bloquant le LPS des bactéries à Gram – ou les LTA des bactéries à Gram +. Cette découverte était basée sur deux hypothèses validées expérimentalement [Wu et al., 2009] :

- la nécessité d'une distance optimale de 14 Å entre deux fonctions protonables sur une molécule linéaire bis-cationique, afin d'assurer des interactions simultanées avec les groupements phosphate anioniques du lipide A (LPS) ;
- la nécessité de la présence de groupes hydrophobes, positionnés de façon appropriée, afin d'assurer une neutralisation de l'activité endotoxine (une chaîne alkyl longue semblant plus appropriée qu'un groupement acyl).

Il a été montré que les groupements guanidine, et par extension, les guanylhyazones, interagissent avec les groupements phosphate par l'intermédiaire de doubles liaisons H, fonction de leur géométrie planaire et du nombre d'atomes N donneurs (ce qui n'est pas envisageable avec de simples amines primaires). Partant de ce constat, Wu et coll., ont étudié une famille de composés lipopolyamines associés à des fonctions guanylhyazones, et ont montré que leur action est dépendante de la longueur de la chaîne alkyl : un maximum d'activité est obtenu pour $n = 16$ C, longueur optimale pour une interaction avec le domaine polyacyl du lipide A (Figure 42) [Wu et al., 2009]. La basicité de la fonction terminale cationique ne semble par contre pas indispensable à la séquestration du LPS : l'efficacité n'est pas augmentée par une augmentation de la force basique.

3.2.8. Aryl-4-guanidinométhyl benzoate & N-aryl-4 guanidinométhyl benzamide et leurs dérivés

Une nouvelle classe de composés antibactériens porteurs de fonctions guanidine a été mise en évidence il y a une dizaine d'années. Ces composés ciblent une protéinase d'origine bactérienne, et apparaissent comme des inhibiteurs compétitifs de la trypsine, *in vitro* [Kato et al., 1993]. Ils sont

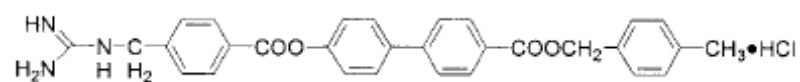


Figure 43: Exemples de structure de type aryl-4-guanidinomethylbenzoate ou N-aryl-4-guanidinomethylbenzamide (d'après [Dai et al., 2005 ; Yu et al., 2008]).

capables d'inhiber la croissance d'*E. coli* (arrêt de la synthèse de l'ADN par déplétion en phosphates), et ont montré une activité intéressante sur *Helicobacter pylori* (Figure 43) [Dai et al., 2005].

Plus récemment, des composés de type aryl-4-guanidinomethylbenzoate et N-aryl-4-guanidinomethylbenzamide ont montré une activité intéressante sur *S. aureus* ou *S. epidermidis* (CMI = 4 à 16 mg/L), mais sont dénués d'activité sur des bactéries à Gram – tels que *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* (CMI > 256 mg/L pour la plupart des souches testées) [Yu et al., 2008].

3.2.9. Un nouveau désinfectant cationique ? Akacid plus®

Akacid plus® serait un nouveau membre de la famille des désinfectants polymériques cationiques. C'est un mélange en proportion 3/1 de poly-(hexamethylene-guanidinium-chloride) et de poly-[2-((2-ethoxy)-ethoxy-ethyl)-guanidinium chloride], à une concentration de 25% en solution aqueuse (Ch.1007, Polymers of Creativity, Vienne, Autriche) [Kratzer et al., 2006]. Ce mélange est hydrosoluble, et présente un large spectre d'activité, à la fois sur les bactéries à Gram – et à Gram +, et sur les fungi [Buxbaum et al., 2006]. Plus récemment, ce produit a été évalué dans un modèle *in vivo* d'infection cutanée provoquée par une souche de SARM [Kratzer et al., 2007]. Les auteurs ont ainsi montré que l'application topique d'Akacid plus® à des concentrations supérieures à 0,5%, était aussi efficace que l'application de mupirocine en crème à 2%, dans ce type d'infection.

Ces 1^{ères} données sont encourageantes quant à une éventuelle application chez l'Homme ; mais sont surtout encourageantes, en terme de recherche et de développement, pour d'autres composés de type cationique... porteurs de fonctions guanidinium.

3.3. Un cas particulier : la platensimycine

En 2006, Wang et coll. ont rapporté la découverte d'un nouvel antibiotique, la platensimycine, possédant une activité antibactérienne intéressante sur les bactéries à Gram + (Figure 44) [Wang et al., 2006]. Cette découverte est le reflet d'une recherche « moderne » de nouveaux antibactériens, qui a commencé avec le criblage de quelques 250000 extraits de produits synthétisés par des microorganismes. La platensimycine est produite par *Streptomyces platensis*, et sa cible d'action (originale !) est la synthèse des acides gras. Les acides gras sont un des éléments constitutifs principaux des membranes bactériennes, et sont produits par l'action répétitive d'une machinerie de

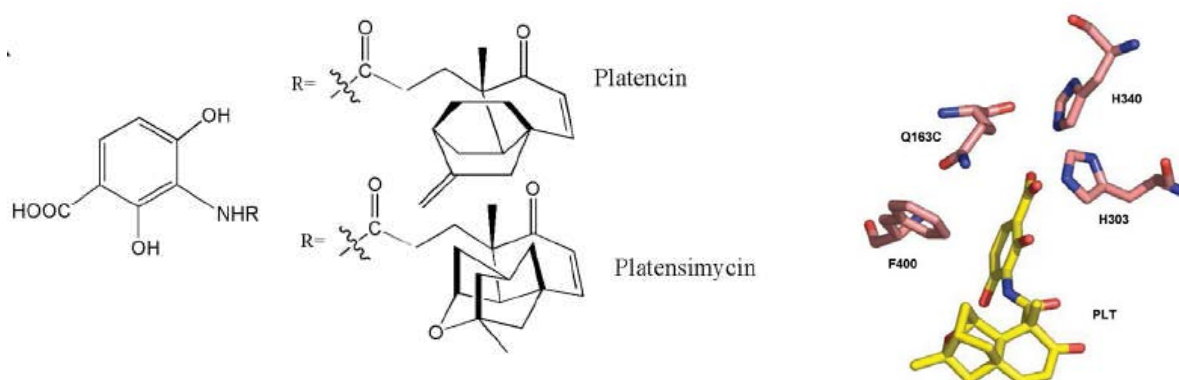


Figure 44 : A : Structure de la platensimycine et de la platencine. B : Platensimycine dans le site actif de FabF (d'après [Wright & Reynolds, 2007]).

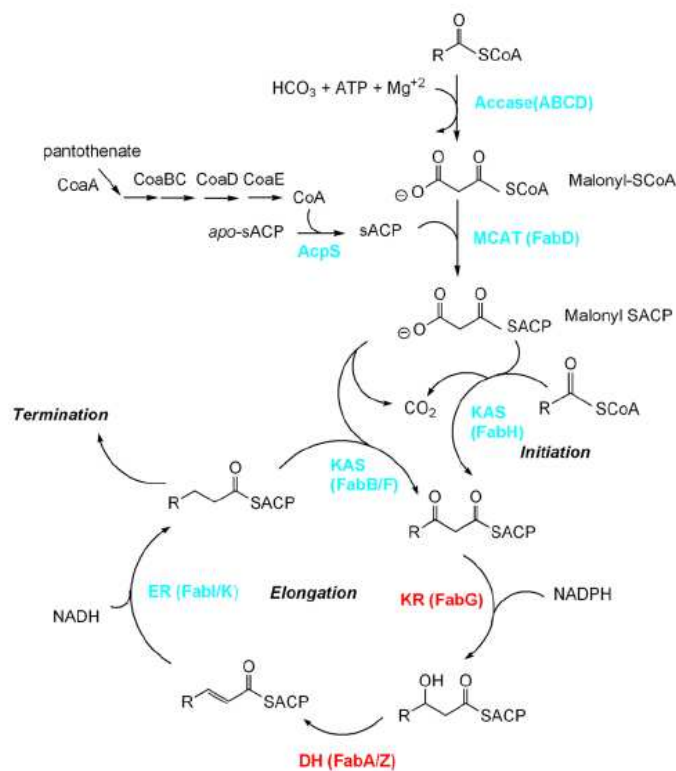


Figure 45 : Voie de synthèse des acides gras et niveau d'action de la platensimycine.

biosynthèse qui allonge la chaîne de deux carbones à chaque fois. La cible de la platensimycine est une enzyme clé de cette machinerie : la β -kétol-acyl-ACP (acyl carrier protein) synthase, connue sous le nom de FabF [Brown, 2006 ; Häbich & von Nussbaum, 2006]. Wang et coll. ont montré que la platensimycine agit comme un inhibiteur compétitif de la « malonyl-acyl-carrier-protein », au niveau du site de fixation du malonyl sur FabF (Figure 45) [Wang et al., 2006].

Cette découverte est exceptionnelle sous plusieurs aspects. Tout d'abord, cette découverte remet en lumière la valorisation des produits d'origine naturelle, et leur intérêt dans la recherche de molécules antibactériennes à mécanisme d'action innovant. Elle relance l'intérêt de la recherche sur les antibiotiques, en nous affirmant que oui, découvrir de nouvelles molécules, innovantes, est encore possible. Les données biochimiques, pharmacologiques et structurales déjà apportées par Wang et coll. sont une base solide à l'élaboration d'une réflexion sur les relations structure-activité. Cette molécule est un challenger potentiel des « super bugs »... mais le chemin jusqu'au médicament et à la commercialisation est encore long...

IV. les calixarènes

4.1. Une brève histoire des calixarènes

(cf. Grare et al., 2006, Pathologie Biologie. 54:470-476)

4.1.1. Historique et structure

Découverts en 1872 par Bayer [Bayer, 1872a-c], leur structure n'a été décrite qu'en 1944 par Zinke & Ziegler [Zinke et al., 1944]. Les calixarènes sont des macrocycles formés de [n] unités phénoliques ($n = 4 - 20$) reliées entre elles par des ponts méthyléniques au niveau des positions ortho de la fonction hydroxyle. Ils sont obtenus par condensation phénol-formaldéhyde en présence d'une base forte. Le nombre de motifs phénoliques constitutifs du macrocycle est indiqué par le chiffre correspondant placé entre les termes calix et arène. La nature et la position des substituants sont données par un préfixe approprié.

Le terme calixarène attribué à ce macrocycle a été introduit pour la première fois en 1978 par Gutsche. Ce nom provient du grec **calix** signifie « vase » ou « calice », se rapportant à la forme de la molécule, et **arène** qui indique la présence de noyaux aromatiques formant un cycle, et liés entre eux par des groupements méthylène en ortho [Gutsche & Muthukrishnan, 1978]. Les **calixarènes « parents » ou non fonctionnalisés** sont des macrocycles formés d'unités phénoliques pontées en position ortho des hydroxyles par des groupements méthylènes. Ils possèdent deux cavités en forme de corbeille :

- une partie inférieure hydrophile (bord étroit) délimitée par les groupements hydroxyles appelée « lower –rim » ;
- une partie supérieure lipophile (bord large) délimitée par les groupements *ter* –butyle en para des hydroxyles appelée « upper –rim ».

Fonctionnaliser un calixarène consiste à le modifier chimiquement par greffage des groupements fonctionnels, permettant ainsi la synthèse des nouvelles molécules avec diverses applications. Elle permet aussi le contrôle de la conformation de ces molécules et constitue par la suite un obstacle pour l'inversion conformationnelle qui a pour origine le pivotement d'un groupement phénoxy autour de l'axe généré par les groupements méthyléniques adjacents. Quatre sites sont susceptibles d'être modifiés (Figure 46) :

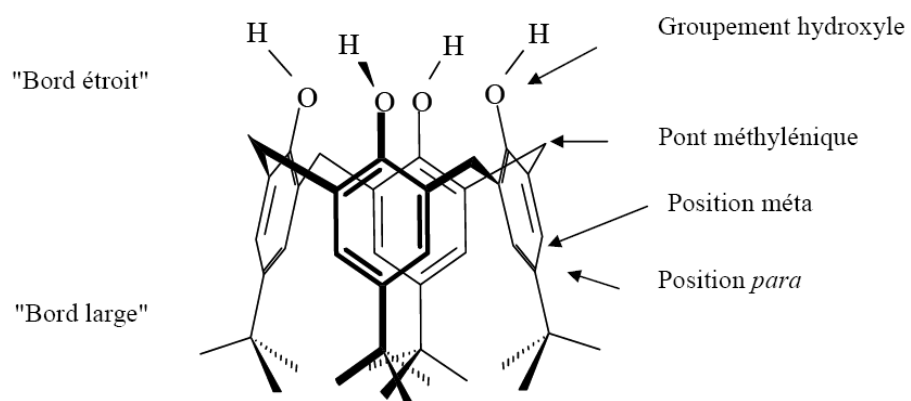


Figure 46 : Sites susceptibles d'être chimiquement modifiés sur un calix[4]arène.

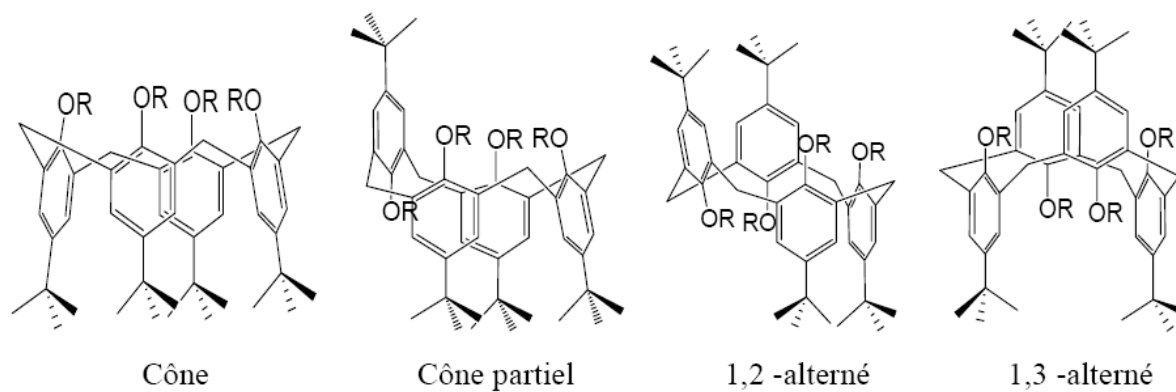


Figure 47 : les 4 conformations observées pour un calix[4]arène.

- les **positions para** des unités phénoliques du calixarène, après élimination des groupements *ter* –butyle présents dans le calixarène parent ;
- les **positions méta** des unités phénoliques du calixarène ;
- au niveau des **ponts méthyléniques** entre noyaux phénoliques ;
- au niveau des **groupements hydroxyle**.

La dernière possibilité de modification est la plus répandue car elle permet de bloquer le calixarène sous une conformation de choix et de modifier les propriétés du macrocycle. L'introduction d'un substituant, peut accroître la solubilité des calixarènes dans les diluants organiques; elle peut même dans certains cas les rendre solubles dans l'eau. Shinkai et coll. ont synthétisé et étudié les propriétés uranophiles des calixarènes rendus hydrophiles par ajout de groupements sulfonate [Shinkai et al., 1987], tandis que Ungaro et coll. préparent des calixarènes hydrosolubles en introduisant des groupements amine ou acide [Arduini et al., 1996]. De nombreuses études ont porté sur la conformation des calixarènes. On peut ainsi distinguer pour le tétramère quatre conformations différentes appelées par Gutsche [Gutsche & Alam, 1988] : cône, cône partiel, 1,2 -alternée et 1,3 – alternée (Figure 47).

Les calixarènes sont des molécules très utilisées pour leurs propriétés complexantes, en particulier concernant les ions métalliques. **La possibilité d'utiliser les calixarènes comme édifices de base, pré-organisés, pour construire des ligands macrocycliques fonctionnalisés plus rigides ou plus flexibles a très vite retenu l'attention des chercheurs.** Le bord inférieur des calix[4]arènes étant constitué de quatre atomes d'oxygène formant une cavité circulaire, Ungaro et al. sont les premiers à utiliser cette propriété pour construire des récepteurs cationiques en remplaçant les hydrogènes phénoliques des calixarènes par des chaînes glycoliques. Les propriétés complexantes de ces calixarènes sont très importantes. Ces propriétés dépendent également de la nature des fonctions greffées [Perret et al., 2006 ; Dinares et al., 2009].

4.1.2. Propriétés biologiques et thérapeutiques des calixarènes

Depuis leur découverte, les calixarènes ont trouvé de nombreux champs d'application, allant de la complexation d'ions à des domaines biologiques tels que : mimes de canaux ioniques ou d'enzymes, agents pour la reconnaissance des protéines, vecteurs de transfection, systèmes de délivrance de

médicaments (nanoparticules lipidiques par exemple)... Mais les données dans le domaine de l'anti-infectieux restent peu nombreuses, cette voie étant encore trop peu explorée. En 1955, Cornforth et coll., ont rapporté la 1^{ère} activité biologique des calixarènes. Un composé de type para-octylcalix[8]arène, portant des unités polyoxyéthylène sur sa couronne inférieure, appelé « macrocyclon », possédait des propriétés anti-tuberculeuses [Cornforth et al., 1955]. Le mécanisme par lequel cette molécule agissait sur *Mycobacterium tuberculosis* était totalement différent des mécanismes rencontrés avec les autres molécules anti-tuberculeuses : il perturbe le métabolisme lipidique par inhibition de la triglycéride lipase et d'une phospholipase, inhibant ainsi la croissance bactérienne de *Mycobacterium tuberculosis* [Cornforth et al., 1973 ; Colson et al., 2004]. De façon très intéressante, dans le travail initial de Cornforth et coll. ils ont montré que la longueur des chaînes polyéthylène glycol greffées sur la partie inférieure du calix[8]arène est un élément clé dans l'activité tuberculostatique. Des dérivés du Macrocyclon ont été synthétisés récemment, avec variation de la longueur des chaînes polyéthylène glycol, substitution par des chaînes alkyl en para et variation du substituant terminal [Loiseau et al., 2007]. L'activité anti-tuberculeuse de ces composés n'a cependant pas encore été évaluée.

Puis, pendant près d'une quarantaine d'années, plus aucune publication n'a fait état des propriétés biologiques et/ou thérapeutiques des calixarènes. Il faut attendre le brevet de Hwang et coll., en 1994, qui concernait les **propriétés antivirales** de certains calixarènes [Hwang et al., 1994a]. Cette équipe a ainsi montré une activité de composés de type para-sulfono-calix[n]arènes, sur des virus enveloppés, tels que le VIH ou le HSV. L'injection de ces composés au niveau du site de l'infection entraîne une inhibition de l'entrée du virus, probablement par interactions de type électrostatique avec l'enveloppe virale, masquant ainsi les sites de reconnaissance des récepteurs cellulaires.

Lamartine et coll. ont étudié les propriétés anti-infectieuses de divers calixarènes hydrosolubles. Un 1^{er} criblage a été réalisé sur *Corynebacterium* spp. Parmi les composés, 7 se sont révélés actifs, et une activité supplémentaire a été mise en évidence sur des champignons (*Fusarium solani*) [Lamartine et al., 1997]. Mais ces composés n'ont hélas pas été étudiés sur des bactéries ou des champignons d'intérêt médical. Dans une autre approche, des mimétiques de vancomycine constitués d'un calixarène fonctionnalisé sur la couronne supérieure par une anse peptidique ont été développés. L'activité antibactérienne de ces molécules a été comparée à celle de la vancomycine sur différentes bactéries à Gram+ et à Gram- : différentes souches de *S. aureus* (sensibles ou résistantes à la méticilline, SARM), *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. coli*. Les concentrations minimales inhibitrices

(CMI) rapportées montrent des activités modérées à bonnes sur les bactéries à Gram+ (CMI = 8 mg/L pour les différentes souches de *S. aureus* et 16 mg/L pour *E. faecalis* et *S. pneumoniae*) mais encore bien supérieures à celles obtenues avec la vancomycine. Les composés testés sont par contre dépourvus d'activité sur *E. coli* (CMI > 64 mg/L), de même que les glycopeptides [Casnati et al., 1996].

De part leur structure chimique, leur flexibilité conformationnelle, et du nombre de groupements SO₃, les para-sulfono-calix[n]arènes, présentent des analogies avec les glycosaminoglycanes tels que l'héparine [Hwang et al., 1991]. Les propriétés anti-thrombotiques de ces composés et de dérivés O-monosubstitués ont été explorées *in vitro* [Perret et al., 2006]. Différentes concentrations ont été testées et ont montré que ces composés sont capables d'allonger les temps de coagulation (temps de thromboplastine activé, temps de thrombine). Les calixarènes testés semblent capables d'interagir avec le cofacteur II de l'héparine, activation comparable à ce qui est obtenu avec le dermatane-sulfate [Perret et al., 2006]. L'activation de l'antithrombine est cependant 10 à 50 fois moindre que ce qui est observé avec l'héparine.

Les calixarènes ont aussi été étudiés pour leurs propriétés de mimes enzymatiques (métalloenzymes, acyltransférase, ribonucléase, ATPase, aldolase, hème...) [Agrawal & Bhatt, 2004], d'inhibiteurs enzymatiques [Aubert-Faucher et al., 1999], ou d'ionophores sélectifs [Izzo et al., 2008]. L'inhibition de la L-lysyl-oxydase a par exemple été rapportée dans un brevet sur une application dans le traitement et la cicatrisation des plaies cutanées [Aubert-Faucher et al., 1999]. Cette inhibition s'explique par la présence d'interactions électrostatiques entre les chaînes latérales des acides aminés constitutifs de l'enzyme, et les groupements sulfonate du calixarène [Perret et al., 2006]. De façon très intéressante, Izzo et coll. ont montré récemment la capacité de calix[4]arènes cationiques (chaînes spermidines), à jouer le rôle d'ionophores anions-sélectifs, permettant l'efflux de H⁺, et le blocage du transport de Cl⁻ en présence d'autres anions interférents [Izzo et al., 2008]. Pour les calixarènes porteurs de groupements sulfonates, par exemple, Droogmans et coll. ont montré que ces composés sont capables d'inhiber les canaux ioniques régulés en fonction du volume (« volume-regulated ionic channel », VRAC), présents sur les cellules endothéliales [Droogmans et al., 1998].

Un des derniers domaines d'investigation concernant les calixarènes en biologie, concerne la détection des prions responsables de la maladie de Creutzfeldt-Jacob. La protéine prion (PrP^c) et sa forme anormale (PrP^{sc}) possèdent une séquence constituée de nombreuses histidines, capables de lier des cations métalliques (partie protéolytique), et un core présentant une forte charge négative,

dans lequel on retrouve une ou plusieurs poches chargées positivement (riches en lysine et en arginine). La présence de cette poche chargée positivement est nécessaire à la fixation de la PrP sur les récepteurs héparane-sulfates et laminines présents à la surface des cellules. Etant donné la similitude de structure entre les para-sulfono-calix[n]arènes et les glycosylaminoglycanes, la liaison de ces composés à la PrP a été évalué, par Western Blot [Perret et al., 2006]. Il a ainsi été démontré une interaction forte avec la PrPsc issue de cerveaux de bovins, avec une amplification très importante de la détection, permettant la détection de faibles quantités de PrPsc. D'autres développements sont actuellement envisagés : un test ELISA (bioMérieux), avec un composé de type mono-aminoéthoxy-para-sulfonatocalix[6]arène qui pourrait recouvrir la surface des puits d'une plaque 96 puits, le calixarène remplaçant alors les anticorps de capture habituellement utilisés dans les tests ELISA [Perret et al., 2006].

4.1.3. Autres propriétés

De nombreux autres domaines d'application sont explorés avec les calixarènes. La constitution de nanoparticules lipidiques à partir de para-dodecanoylcalix[4]arène a par exemple été réalisé ; en présence de sérum albumine bovine (BSA), ces particules ne s'agrègent pas, et laisse ouverte la porte à une éventuelle utilisation en tant que transporteurs administrables par voie intraveineuse [Gualbert et al., 2003 ; Mutihac, 2008]. Une équipe a ainsi utilisé des calixarènes sulfonés pour améliorer la solubilité et la biodisponibilité de la nifédipine, un antagoniste calcique utilisé dans le traitement de l'angor et de l'hypertension [Yang et al., 2008].

D'autres équipes ont utilisé des calixarènes fonctionnalisés (groupements guanidinium sur la couronne supérieure, chaîne alkyl sur la couronne inférieure) et ont montré que ces composés sont capables de se lier à l'ADN, de le condenser, et, dans certains cas, d'améliorer la transfection de gènes dans les cellules, en fonction de leur structure (chaînes hexyl et octyl) et de leur lipophilie [Sansone et al., 2006]. Cependant, la capacité de transfection de ces composés reste faible, et ils se caractérisent par une toxicité cellulaire importante aux doses nécessaires pour la transfection (10-20 μ m). Cette même équipe a travaillé sur les relations structure-activité, et a montré que l'attachement des fonctions guanidinium au niveau des groupements OH de la couronne basse, à l'aide d'une « spacer » de 3 carbones, augmente de façon significative la capacité de transfection (capacité supérieure à celle de la lipofectine commerciale), associée à une toxicité faible [Bagnacani et al.,

2008]. D'autres calixarènes, amino-substitués, ont montré une capacité d'auto-assemblage, et d'interactions avec l'ADN double-brin [Shahgaldian et al., 2008]. Cela laisse ouverte la porte aux calixarènes fonctionnalisés en tant que vecteur de gènes pour la transfection de cellules.

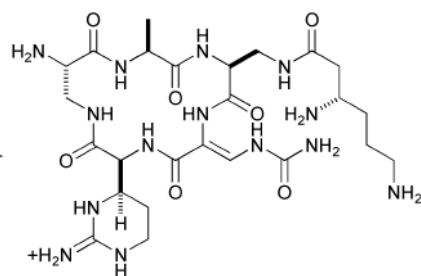
Une utilisation des calixarènes, enchâssés dans des vésicules lipidiques, a été validée pour la mise en évidence colorimétrique de certaines protéines, de façon un peu similaire à ce qui a été envisagé avec les prions. Les auteurs ont ainsi montré que les interactions entre les calixarènes présents dans les vésicules chromogéniques, et les domaines chargés présents à la surface des protéines, pouvaient résulter en une réponse colorimétrique facilement mesurable [Kolusheva et al., 2006]. Ce plate-forme facilement préparée pourrait être un outil très utile pour l'identification des protéines à des fins diagnostiques, par exemple après séparation par chromatographie, d'un mélange de protéines inconnues ; ou pour étudier la surexpression de certaines protéines lors de processus physiologiques ou pathologiques.

4.1.4. Toxicité des calixarènes

Afin de pouvoir appliquer l'utilisation des calixarènes en thérapeutique humaine, il est nécessaire d'évaluer leur toxicité *in vitro*, sur lignées cellulaires, mais aussi les interactions éventuelles *in vivo*, entre ces composés et divers éléments biologiques. Concernant le pouvoir hémolytique de ces molécules, les données obtenues par Da Silva et coll. ont montré que l'activité hémolytique est fonction du nombre d'unités monomériques : 30% pour un calix[8]arène, 8% pour un calix[6]arène, et 0,5% pour un calix[4]arène (pour une concentration de 200 mM) [DaSilva et al., 2004]. La présence d'une fonction éthoxy-amine augmente l'effet hémolytique pour les calix[4] et [6]arènes, mais diminue celui des calix[8]arènes. Perret et coll., ont montré quant à eux, que certains calixarènes porteurs de groupements phosphonates, ne sont pas toxiques, *in vitro*, sur fibroblastes [Perret et al., 2006]. L'effet de différents calixarènes sulfonés sur l'activation de la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles a été évalué ; les 3 molécules étudiées n'ont induit aucune activation, et ne semblent pas stimuler les neutrophiles [Paclet et al., 2006]. Par ailleurs, Gutsche, en 1985, avait montré l'absence de génotoxicité de ces molécules par le test d'Ames [Gutsche, 1985].

De ces différentes études, il apparaît que les calixarènes sulfonés (composés les plus étudiés), et leurs dérivés, semblent ne pas présenter de cytotoxicité, et sont non hémolytiques à des doses inférieures à 50 mM. Peu de données restent cependant disponibles sur la cytotoxicité des composés

A



B

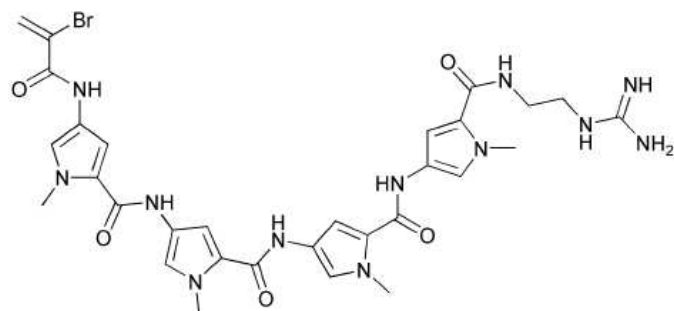


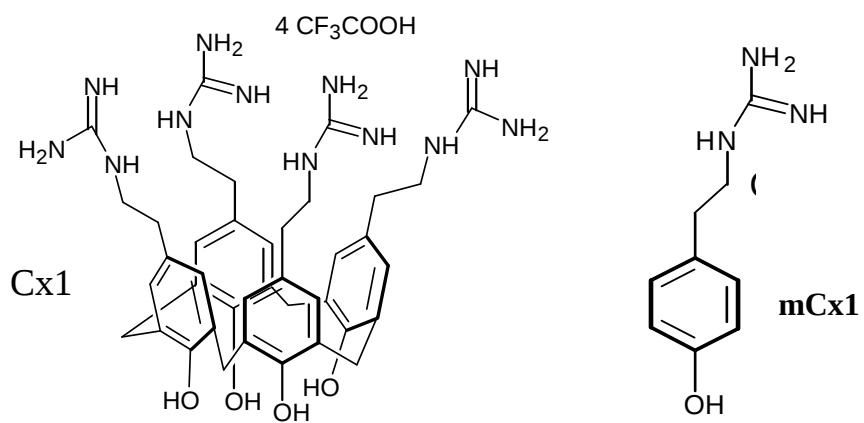
Figure 48 : Exemple de produits naturels contenant des fonctions guanidine (d'après [Berlinck & Kussoga]). A : capreomycine ; B : brostallicine

de type calixarène. Récemment, une équipe a réalisé le marquage d'une calix[4]arène par le 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD chloride), afin de suivre la pénétration du composé dans des cellules CHO (« Chinese Hamster Ovary cells »). Aucune déformation de la surface cellulaire n'a été observée, et le processus de pénétration dans les cellules ne semble pas impliquer des vésicules de clathrine, mais plutôt un phénomène d'invaginations membranaires, qui fusionnent ensuite avec les endosomes, et conduit à une accumulation des molécules marquées dans le cytoplasme [Lalor et al., 2008]. Les auteurs ont par ailleurs étudié la toxicité des composés testés sur deux lignées cellulaires et ont retrouvé des CI_{50} (concentration inhibitrice 50%) de 80 mM sur cellules CHO, et de 8 mM sur cellules HL-60 (lignée promyélocytaire issue d'un patient présentant une leucémie aiguë). L'évaluation de la toxicité sur lignées cellulaires cancéreuses, qui plus est animale pour la 1^{ère}, reste très discutable.

Ainsi de nombreuses données sont encore manquantes, concernant d'autres dérivés calixaréniques, *in vitro* ; et aucune donnée *in vivo* n'est actuellement disponible, à notre connaissance. Ce sera l'objet d'une partie de cette thèse.

4.2. Les calixarènes étudiés dans ce travail

Les bactéries présentant une charge globale nette de surface négative, dont la neutralisation ou la désorganisation contrôlée pourrait résulter en un effet délétère, nous avons développé une approche liée à l'apport de charges positives pré-organisées, permettant une synergie d'interactions avec la paroi bactérienne. Les groupements guanidinium sont reconnus depuis longtemps comme des fonctions actives dans de nombreuses molécules thérapeutiques dans des domaines aussi variés que : antihypertensif, antihistaminique, anti-inflammatoire, antidiabétique (synthaline), anticancéreux, antiviral et antibactérien [Greenhill & Lue, 1993]. Il est par exemple, admis, aujourd'hui, que les composés de type oligoguanidinium (polyarginines, aminosides modifiés par ajout de groupements guanidinium) sont capables de pénétrer efficacement à travers les membranes cellulaires et peuvent servir de systèmes transporteurs à un certain nombre de molécules. Cela a été montré récemment pour les calixarènes fonctionnalisés avec des guanidines, possédant un fort pouvoir de transfection [Bagnacani et al., 2008]. De nombreux produits naturels contiennent des fonctions guanidine, et cette forte charge positive est fréquemment associée à des activités biologiques [Berlinck & Kossuga, 2005 ; Berlinck et al., 2008] ; nous citerons certains peptides antimicrobiens, comme la capréomycine, la viomycine, ou la brostacilline (issue de *Streptomyces distallicus* en 1962 et actuellement en essai



de phase II) (Figure 48). La chimie de synthèse s'intéresse aussi beaucoup aux fonctions guanidine, et ces fonctions se retrouvent dans des molécules aux applications très diverses : mimes peptidiques ou nucléotidiques, chémorécepteurs, catalyseurs, agents chélateurs ou de liaison, transporteurs transmembranaires... jusqu'à leur utilisation en chimie supramoléculaire [Berlinck & Kossuga, 2005 ; Berlinck et al., 2008]. C'est pourquoi nous avons voulu évaluer l'impact en terme d'activité antibactérienne, de la présence de fonctions guanidinium, pré-organisées sur la couronne supérieure d'un calix[4]arène ; peu de données sont présentes dans la littérature, sur l'activité antibactérienne de telles molécules.

Ainsi, la stratégie expérimentale développée dans notre laboratoire repose sur la comparaison des propriétés antibactériennes de dérivés calixaréniques, plate-formes organisatrices de fonctions ioniques diverses, et de leurs monomères phénoliques constitutifs, sur différentes souches bactériennes de référence ; ceci afin d'évaluer si cette pré-organisation est un élément clé et indispensable, à l'activité antibactérienne des calixarènes. Dans le cas de la fonction *para*-guanidinoéthyle, il avait déjà été démontré que le passage de la forme monomérique (forme non organisée, *para*-guanidinoéthylphénol, mCx1) à la forme cyclo-polymérique (forme organisée, *para*-guanidinoéthylcalix[4]arène, Cx1) (Figure 49) résultait en un gain considérable d'activité antibactérienne sur les souches testées [Mourer et al., 2006]. Pour compléter cette étude, et amorcer une orientation en terme de relations structure activité, nous avons étudié un intermédiaire de synthèse (Cx3) et son équivalent monomérique (mCx3), ainsi que d'autres monomères, ne variant que par les fonctions greffées (mCx10, mCx20, mCx30). Les structures des différents composés étudiés dans cette thèse, sont présentées Figure 49.

Vers de nouvelles molécules antibactériennes. Intérêt du *para*-guanidinoéthylcalix[4]arène

Towards new antibacterial drugs. Interest of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene

M. Grare, M. Mourer, J.-B. Regnouf de Vains, C. Finance, R.-E. Duval*

Groupe d'étude des vecteurs supramoléculaires du médicament, (GEVSM), faculté de pharmacie,
UMR 7565, Nancy-Université, CNRS, 5, rue Albert-Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy cedex, France

Reçu le 19 juin 2006 ; accepté le 21 juillet 2006
Disponible sur internet le 04 octobre 2006

Résumé

Nous présentons ici les résultats concernant l'évaluation des propriétés antibactériennes du *para*-guanidinoéthylcalix[4]arène, en comparaison à son équivalent monomérique, le *para*-guanidinoéthylphénol, et à l'hexamidine (Hexomédine®), antiseptique bis-amidinique très utilisé, choisi comme référence dans cette étude du fait de sa relative ressemblance fonctionnelle. Les activités antibactériennes des trois composés ont été évaluées par méthode de microdilution en bouillon Mueller Hinton, sur cinq souches bactériennes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, en accord avec les recommandations du CA-SFM et du CLSI (anciennement NCCLS). En parallèle, les effets des trois composés sur la viabilité de cellules eucaryotes MRC-5 en culture ont aussi été évalués en utilisant un test MTT. Les résultats obtenus lors de cette étude confirment l'absence d'activité antibactérienne du composé monomérique (CMI $\geq$ 512 mg/l) et montrent une activité du calixarène comparable à celle de l'hexamidine, à la fois sur les bactéries à Gram+ et à Gram- (CMI = 4 mg/l pour *E. coli*, 8 mg/l pour les deux souches de *S. aureus*) et un peu moindre sur *E. faecalis* et *P. aeruginosa* (CMI = 32 mg/l). Parallèlement, les composés monomériques et calixaréniques n'induisent que peu de modifications de la viabilité des cellules MRC-5 et ce jusqu'à 168 heures d'exposition pour des concentrations atteignant 10^{-4} mol/l, alors que l'hexamidine présente un effet notoire et croissant au cours du temps, et ce, à des concentrations 100 à 1000 fois moindres. Cette étude tend à confirmer l'importance de l'organisation du *para*-guanidinoéthylphénol en tétramère cyclique pour l'obtention d'une activité antibactérienne, comparable à celle d'un antiseptique très utilisé.

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

We present here the results concerning the antibacterial properties evaluation of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene, compared with its constitutive monomer, the *para*-guanidinoethylphenol, and hexamidine (Hexomédine®), an antiseptic from the diamidine family widely used in therapeutic, chosen as a reference in this study for its resemblance in terms of functional groups. Antibacterial activities of those three compounds were evaluated by microdilution methods, in Mueller Hinton broth, onto 5 bacterial strains: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, according to CA-SFM and CLSI (formerly NCCLS) approved standards. In parallel, the effects of these three compounds on MRC-5 eukaryotic cell viability were evaluated with MTT assay. The results obtained here confirm a lack of activity for the monomer compound (MIC $\geq$ 512 mg/l) and a real antibacterial activity for the calixarene, comparable to hexamidine. This activity is expressed, both on Gram+ and Gram- bacteria (MIC = 4 mg/l for *E. coli*, 8 mg/l on both *S. aureus* strains) and at a lesser degree on *E. faecalis* and *P. aeruginosa* (MIC = 32 mg/l). Similarly, both compounds, monomer and calixarene, slightly induce any modification on MRC-5 cells viability, and this until 168 h of treatment for concentrations reaching 10^{-4} mol/L while hexamidine demonstrates a significant and increasing effect during the time of experiment and this for 100 to 1000 times lower concentrations. Thus, this study tends to confirm the significance of the organization of the *para*-guanidinoethylphenol monomer into its cyclic calixarenic tetramer for the gain of an antibacterial activity, similar to a widely used antiseptic one.

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : raphael.duval@pharma.uhp-nancy.fr (R.-E. Duval).

Mots clés : Infections Nosocomiales ; Calixarènes ; Antibactériens ; CMI ; CI_{50} ; Index de Sélectivité

Keywords: Nosocomial Infections; Calixarenes; Anti-Bacterial Drugs; MIC; IC_{50} ; Selectivity Index

1. Introduction

Actuellement, les infections nosocomiales (IN) constituent un problème majeur en santé publique. Les IN sont préoccupantes de par leur morbidité importante, de la mortalité associée, du surcoût hospitalier non négligeable et de l'émergence de bactéries multirésistantes (BMR). Une enquête nationale sur la prévalence des IN a été menée en 2001 par le Raisin (Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales) [1]. Cette enquête a montré un taux de prévalence des IN de 6,9 % (nombre de patients infectés un jour donné en fonction du nombre de patients hospitalisés présents le même jour). Cette prévalence est comparable à celle retrouvée lors d'enquêtes multicentriques réalisées dans d'autres pays européens (Espagne 1990 : 9,9 % ; Norvège 1991 : 6,3 % ; Allemagne 1994 : 3,6 % ; Angleterre 1993–1994 : 9 %). Les IN les plus fréquemment rencontrées sont les infections urinaires (40 %), les infections respiratoires (18,7 %), les infections du site opératoire (10 %) et les infections de la peau et des tissus mous (10 %). Parmi les germes responsables d'IN, les bactéries apparaissent en première ligne. Les plus souvent en cause sont *Escherichia coli* (23 %), *Staphylococcus aureus* (20 %), *Pseudomonas aeruginosa* (11 %), *Enterococcus spp* (6 %). De façon globale, le taux de résistance aux antibiotiques des bactéries responsables d'IN est élevé et la proportion de BMR observée en France est parmi les plus importantes d'Europe ; les pays d'Europe du Nord (Danemark, Pays Bas, Norvège...) étant caractérisés par un très faible taux de multirésistance aux antibiotiques. Cette situation préoccupante est liée à un usage excessif et souvent inadapté des antibiotiques : prescriptions inappropriées, doses inadéquates, durée de traitement inadaptée... À l'heure actuelle, 64 % des *S. aureus* isolés au cours d'IN sont résistants à la méticilline (on parle de Sarm : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline). À cela s'ajoute l'émergence de souches de Sarm résistantes à de nombreuses autres familles d'antibiotiques : macrolides, aminosides, fluoroquinolones, voire glycopeptides. D'autres germes hospitaliers multirésistants posent problème :

- les entérobactéries résistantes aux β lactamines (11 %) (on parle de EBLSE : Entérobactéries à β -Lactamase à spectre étendu) ;
- les entérocoques résistants aux glycopeptides (1,5 %) (on parle d'ERV : Entérocoques résistants à la vancomycine) ;
- *P. aeruginosa* résistant aux céphalosporines de troisième génération (17 %)...

Le danger est de se retrouver face à une impasse thérapeutique :

- soit aucun antibiotique n'est plus disponible à des fins de traitement d'infections nosocomiales bactériennes généralement graves puisque touchant des patients fragilisés ;

- soit les antibiotiques restant à disposition présentent une toxicité telle que leur usage est limité, voire non envisageable.

En Lorraine, la CRH (Cellule régionale d'hygiène), en partenariat avec le CCLIN-Est (Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales) a effectué une enquête de prévalence des infections nosocomiales en novembre 2004 [2]. Cette enquête a montré un taux de prévalence de 6,1 %. La répartition des IN en fonction du site était comparable à celle observée lors de l'enquête nationale de 2001 : infections urinaires 33 %, infections respiratoires 22 %, infections du site opératoire 13 % et infections de la peau et des tissus mous 11 %. Les bactéries représentaient 90 % des germes isolés, parmi lesquelles quatre espèces représentaient plus de 60 % des bactéries identifiées : *E. coli* 22,6 %, *S. aureus* 22,1 %, *P. aeruginosa* 13,7 % et *Enterococcus spp* 4,8 %. 63,8 % des souches de *S. aureus* étaient résistantes à la méticilline ; et 35,6 % des EBLSE isolées d'infections urinaires étaient des bactéries de l'espèce *E. coli*.

Du fait de l'importance des IN, et de la dissémination de bactéries présentant des résistances aux antibiotiques utilisés en routine, la recherche de nouvelles molécules antibactériennes est un sujet d'importance croissante.

L'approche thérapeutique antibactérienne actuellement développée au sein de notre laboratoire réside principalement en la mise en place et au développement de stratégies expérimentales faisant appel à l'utilisation de macrocycles de synthèse, dérivés fonctionnels conçus et élaborés à partir de calixarènes.

Les calixarènes sont le produit d'une longue histoire remontant à 1872, lorsque Adolf von Bayer décrit les premières réactions entre les phénols et les aldéhydes [3–5]. Leur description moléculaire n'a cependant pu être faite qu'en 1940 par Niederl et Vogel [6]. C'est en 1978 que Gutsche utilise pour la première fois la dénomination : calixarène [7]. Ce nom a été choisi pour la ressemblance de forme entre le tétramère cyclique et un type de vase grec appelé calix (calice) (Fig. 1). Le suffixe provient quant à lui de la présence des unités phénoliques.

Un calixarène est un macrocycle (oligomère cyclique) constitué de n unités phénoliques ($n = 4$ à 8 pour les plus courants, 9 à 16 plus rarement) parasubstituées ou non et reliées entre elles par des ponts méthyléniques. Le nombre d'unités phénoliques dont il est constitué est représenté entre crochets, lesquels sont affectés du préfixe « calix » et du suffixe « arène ». Ainsi, un macrocycle composé de quatre unités phénoliques sera nommé : calix[4]arène. Parmi les différentes conformations du calix[4]arène, la conformation cône, qui nous intéresse plus particulièrement est représentée Fig. 2.

Les calixarènes sont des composés qui se prêtent à de nombreuses transformations chimiques, ouvrant un champ d'applications très variées, allant de l'extraction-séparation d'ions

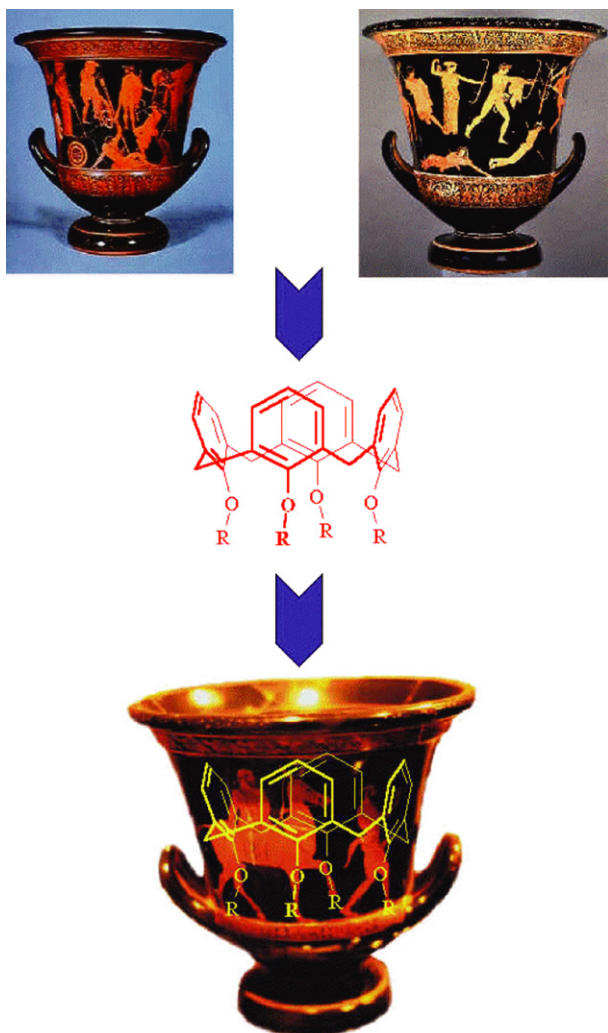


Fig. 1. Association Calice–Calixarène.

métalliques au domaine biomédical [8,9]. Pour ce dernier, les travaux publiés traitent par exemple de leurs propriétés de reconnaissance moléculaire et ionique [10–13], de catalyseurs biomimétiques [14–17] ou d'inhibiteurs d'enzymes [18–20]. Sur un plan thérapeutique, certains calixarènes ont montré d'intéressantes activités antibactériennes [21], antifongiques, antivirales et anticancéreuses [22,23], mais aussi un intérêt

potentiel dans le traitement de la thrombose [24] et de pathologies de type fibrose [25].

L'évaluation de l'activité antibiotique des calixarènes n'apparaît que dans quelques brevets et publications. L'exemple le plus ancien est celui du macrocyclon, développé dans les années 1950 [26–28]. Le macrocyclon est un dérivé poly-oxy-éthylé qui est phagocyté par les macrophages et qui perturbe le métabolisme lipidique par inhibition de la triglycéride lipase et d'une phospholipase, inhibant la croissance bactérienne de *Mycobacterium tuberculosis* [29].

Dans une autre approche, des mimétiques de vancomycine constitués d'un calixarène fonctionnalisé sur la couronne supérieure par une anse peptidique ont été développés. L'activité antibactérienne de ces molécules a été comparée à celle de la vancomycine sur différentes bactéries à Gram+ et à Gram– : différentes souches de *S. aureus* (sensibles ou résistantes à la méticilline, SARM), *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. coli*. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) rapportées montrent des activités modérées à bonnes sur les bactéries à Gram+ (CMI = 8 mg/l pour les différentes souches de *S. aureus* et 16 mg/l pour *E. faecalis* et *S. pneumoniae*) mais encore bien supérieures à celles obtenues avec la vancomycine. Les composés testés sont, en revanche, dépourvus d'activité sur *E. coli* (CMI > 64 mg/l), de même que les glycopeptides [30].

Les bactéries présentant une charge globale nette de surface négative, dont la neutralisation ou la désorganisation contrôlée pourrait résulter en un effet délétère, nous avons développé une approche supramoléculaire liée à l'apport de contre charges positives préorganisées. En ce sens, la stratégie expérimentale développée dans notre laboratoire repose sur la comparaison des propriétés antibactériennes de dérivés calixaréniques, plate-formes organisatrices de fonctions ioniques diverses, et de leurs monomères phénoliques constitutifs, sur différentes souches de référence : *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213 et *E. faecalis* ATCC 29212. Dans le cas de la fonction *para*-guanidinoéthyle, nous avons récemment démontré [31,32] que le passage de la forme monomérique (forme non organisée, composé 2) à la forme cyclopolymérique (forme organisée, composé 3) (Fig. 3) résultait en un gain considérable d'activité antibactérienne sur les quatre espèces bactériennes testées.

Le travail présenté ici confirme les résultats précédemment obtenus et nous permet de juger de l'intérêt de nos résultats en

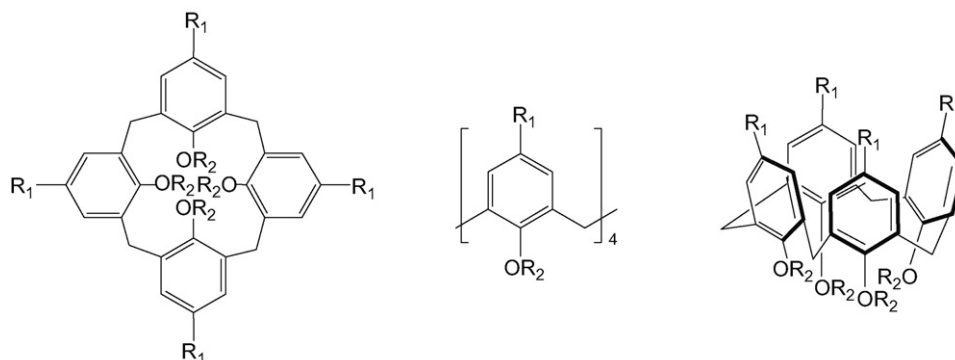


Fig. 2. Différentes représentations du calix[4]arène.

utilisant comme référence le diisethionate d'hexamidine (Hexomédine[®], composé **1**) (Fig. 3). Cet antiseptique couramment utilisé en thérapeutique a été choisi pour la présence de la fonction amidinium se rapprochant des calixarènes et phénols étudiés, aucun produit à fonction alkylguanidinium n'étant actuellement disponible sur le marché en France.

2. Matériels et méthodes

2.1. Souches bactériennes

Selon les recommandations conjointes du « Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie » (CA-SFM) [33] et du « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI, anciennement « National Committee for Clinical Laboratory Standards » ou NCCLS) [34], cinq souches bactériennes de référence ont été utilisées pour notre étude : *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213 et *E. faecalis* ATCC 29212. Les bactéries sont cultivées soit sur gélose Mueller-Hinton (Difco, 225250), soit en bouillon Mueller-Hinton (Difco, 275730), à 35 °C.

2.2. Molécules

Les différentes substances testées ont été préparées sous forme de solution aqueuse à 10^{-2} mol/l. Les composés **2** et **3** de cette étude ont été préparés selon les protocoles publiés [32]. Le diisethionate d'hexamidine **1** a été préparé par évaporation puis lyophilisation de la solution commerciale d'Hexomédine[®] à 1%. Chaque lot de ces produits a fait l'objet d'analyses par RMN du proton et analyse centésimale des éléments par combustion.

2.3. Détermination des CMI

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par la méthode standardisée de microdilution en milieu liquide (microplaque 96 puits à fond « U », Greiner), en bouillon Mueller-Hinton, avec un inoculum final de 10^5 – 10^6 UFC/ml, en fonction des espèces bactériennes, conformément aux recommandations du CLSI et du CA-SFM.

2.4. Cellules eucaryotes

Les cellules eucaryotes utilisées pour notre étude sont les cellules diploïdes MRC-5 (fibroblastes embryonnaires de poumon humain), cultivées en milieu minimum essentiel (MEM, Invitrogen, 41090) à 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen, 10270, Lot 40Q5150K) en chambre humide à 37 °C, sous 5 % CO₂.

2.5. Test MTT

Pour évaluer l'effet sur la viabilité des cellules MRC-5 des différents composés testés, nous avons utilisé la technique du MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényltétrazolium ; MTT, Aldrich, 135038), décrite par Mossman [35] et modifiée par Harmand et al. [36]. Elle est fondée sur la réduction des sels de tétrazolium de couleur jaune, en cristaux de formazan violets, principalement par les déhydrogénases mitochondriales. La quantité de formazan formée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. L'absorbance est lue à 540 nm, avec une longueur d'onde de référence à 690 nm, à l'aide d'un lecteur plaque Elisa (Titertek Multiscan MCC/340 MK II apparatus, Labsystems, Helsinki, Finland).

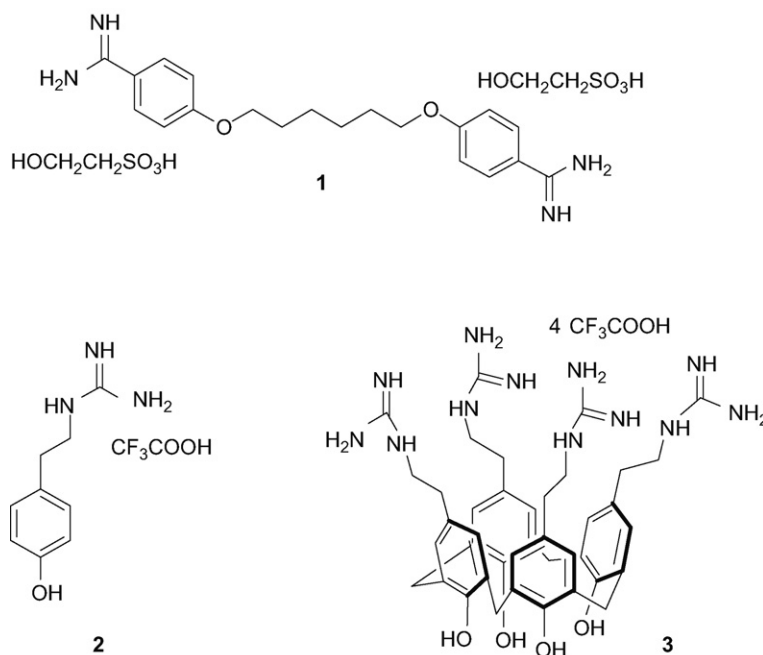


Fig. 3. Structure des différentes molécules testées. **1** (Hexomédine[®], diisethionate d'hexamidine). **2** (*para*-guanidinoéthylphénol). **3** (tétra-*para*-guanidinoéthylcalix [4]arène).

3. Résultats

- Les résultats présentés dans le **Tableau 1** démontrent :
- l’absence d’activité antibactérienne du composé **2** (le *para*-guanidinoéthylphénol : le monomère) ;
 - l’activité antibactérienne du composé **1** (le diiséthionate d’hexamidine: le composé de référence) à la fois sur les bactéries à Gram+ et à Gram– ;
 - l’activité du composé **3** (le *para*-guanidinoéthylcalix[4]arène) qui est comparable à celle du composé **1**. Ainsi,

Tableau 1
Concentrations minimales inhibitrices (CMI), en mg/L, obtenues pour les composés **1**, **2** et **3**, sur les différentes souches bactériennes testées. (*n* = 4)

CMI (mg/l)	Composé 1	Composé 2	Composé 3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8	512	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	4	512	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	< 1	512	8
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2	≥ 512	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	32	≥ 512	32

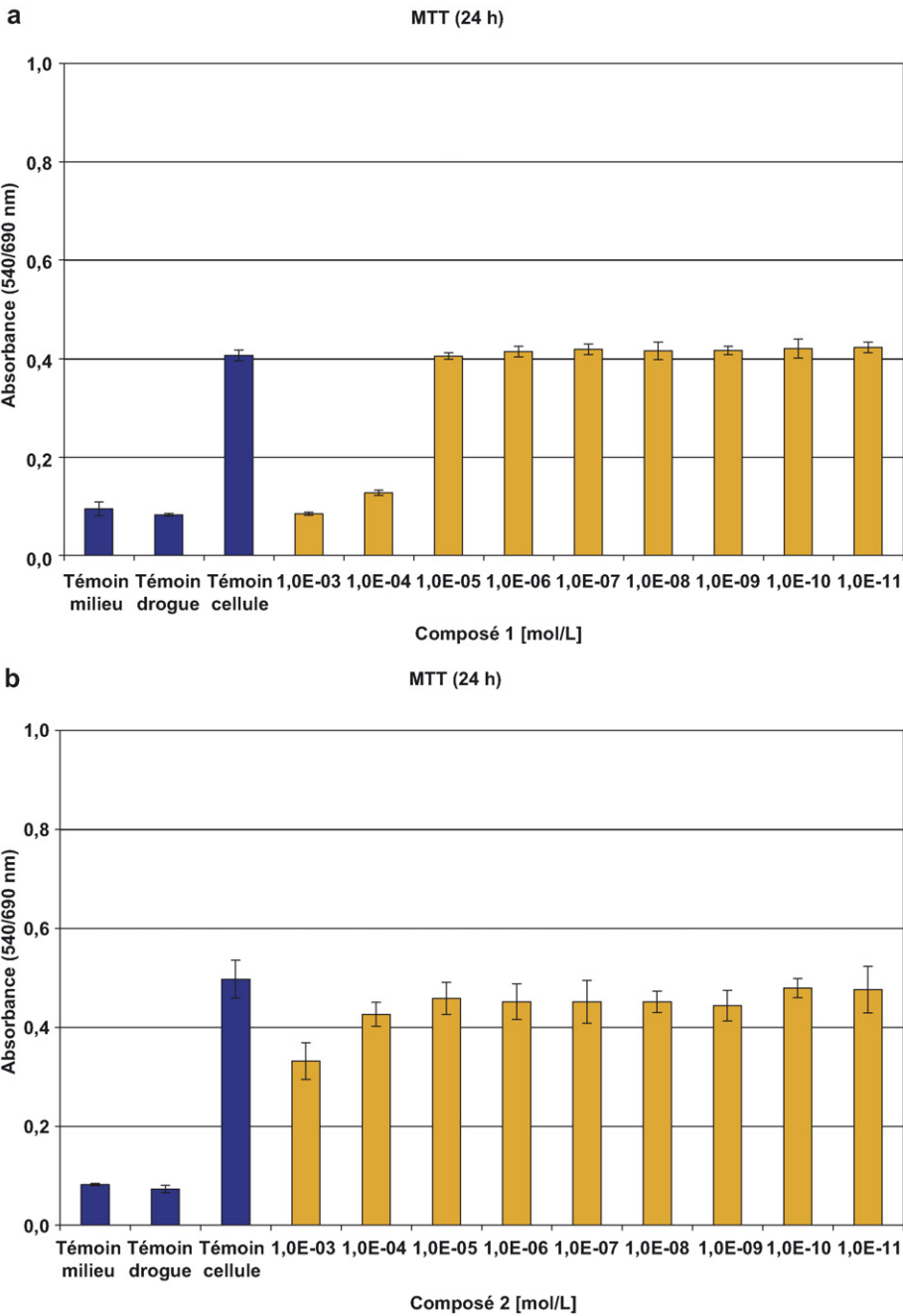


Fig. 4. Test de viabilité au MTT sur cellules MRC-5 après 24 heures d’incubation avec le composé **1** (4a), le composé **2** (4b) ou le composé **3** (4c). (*n* = 3). Témoin milieu : milieu MEM-10 % SVF, sans cellules MRC-5. Témoin substance : milieu MEM-10 % SVF, sans cellules MRC-5, avec la plus forte concentration en composé **1**, **2** ou **3** (10^{-3} mol/l). Témoin cellules : cellules MRC-5 en culture (milieu MEM-10 % SVF), non traitées.

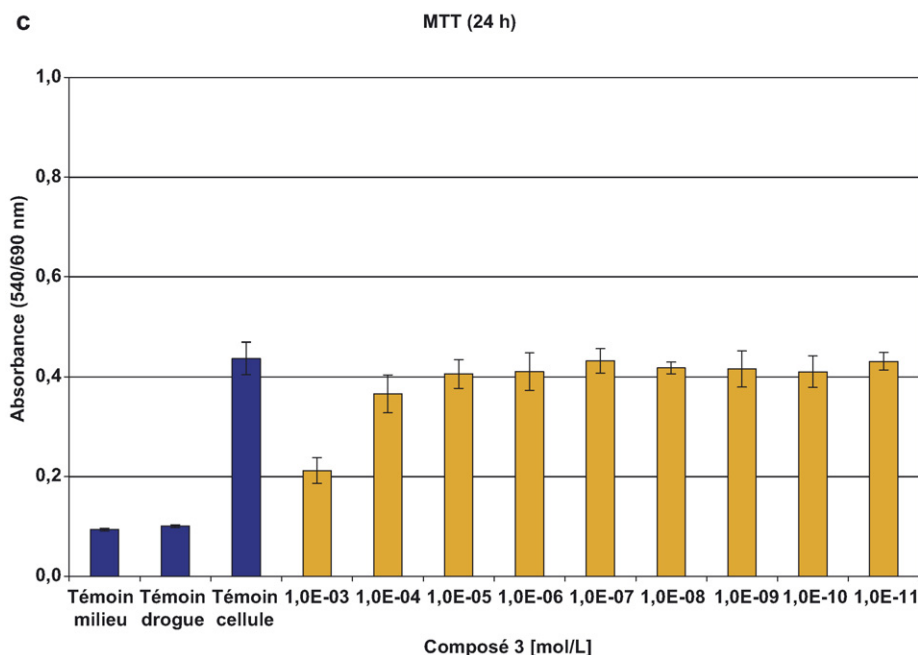


Fig. 4. (suite)

pour le composé **3**, nous obtenons des valeurs de CMI de 4 mg/l pour *E. coli*, de 8 mg/l pour les deux souches de *S. aureus*, alors que *E. faecalis* et *P. aeruginosa* se montrent moins sensibles (CMI = 32 mg/l). Comparativement, le composé **1** semble plus actif sur les bactéries à Gram+ (avec des valeurs de CMI égales à 4 mg/l ou < 1 mg/l pour les deux souches de *S. aureus* et 2 mg/l pour *E. faecalis*), mais apparemment moins efficace sur *E. coli* (CMI = 8 mg/l).

Les résultats présentés Fig. 4 (4a, 4b et 4c) et Tableau 2 montrent que :

- les composés **2** et **3** n'induisent qu'une très faible modification de la viabilité des cellules MRC-5 en culture, et ce jusqu'à 168 heures d'exposition avec respectivement, des valeurs de CI_{50} égales à $1,5 \cdot 10^{-3}$ et $7,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l après 24 heures de traitement ;
- le composé **1** entraîne une diminution croissante au cours du temps de la viabilité des cellules MRC-5 en culture pour des doses moindres, avec des valeurs de CI_{50} égales à $7,7 \cdot 10^{-5}$ à 24 heures et $4,3 \cdot 10^{-6}$ mol/l après 168 heures de traitement.

Tableau 2

Valeurs de CI_{50} obtenues pour les composés **1**, **2** et **3**, après 24, 48 et 168 heures d'incubation sur cellules MRC-5. ($n = 3$)

CI_{50} (mol/l)	Composé 1	Composé 2	Composé 3
24 heures	$7,7 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$7,3 \cdot 10^{-4}$
48 heures	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^{-4}$
168 heures	$4,3 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^{-4}$

Tableau 3

Détermination de l'index de sélectivité (IS), à 24 heures, pour les composés **1**, **2** et **3**

IS (CI_{50}/CMI)	Composé 1	Composé 2	Composé 3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6	0,86	223
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13	0,86	111
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	51	0,86	111
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	26	$\leq 0,86$	28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2	$\leq 0,86$	28

De fait, si on détermine l'index de sélectivité (IS) pour les trois composés (Tableau 3), il apparaît :

- que les valeurs d'IS obtenues pour le composé **3** sont très intéressantes, quelle que soit la souche testée (IS = 223 pour *E. coli*, 111 pour les deux souches de *S. aureus* et 28 pour *E. faecalis* et *P. aeruginosa*) ;
- et que ces valeurs sont très nettement supérieures à celles obtenues pour le composé **2** ($IS \leq 0,86$ pour les cinq souches étudiées), ainsi que pour le composé **1**, le diiséthionate d'hexamidine, composé de référence (IS = 6 pour *E. coli*, 13 et 51 pour les deux souches de *S. aureus*, 26 pour *E. faecalis* et 2 pour *P. aeruginosa*).

4. Discussion

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude confirment ceux de l'étude préliminaire quant au rôle que semble jouer la préorganisation spatiale de monomères *para*-guanidinoéthylphénol en un tétramère cyclique pour l'obtention d'une activité antibactérienne. De plus, par comparaison avec l'hexamidine, choisie comme référence, le composé **3**

apparaît comme celui conjuguant l'activité antibactérienne la plus intéressante associée à une quasi-absence d'effet notable sur la viabilité des cellules MRC-5 en culture.

Ces résultats sont particulièrement encourageants quant au développement de notre approche avec d'éventuelles applications thérapeutiques pour le calixarène étudié ici. Néanmoins, il reste à définir la ou les cibles d'action de ce composé. En ce sens, des travaux sont actuellement en cours sur ces trois molécules ainsi que sur de nombreux autres dérivés, afin de mieux appréhender les relations structure-activité.

Remerciements

Ce travail a été financé par le ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, et le Centre national de la recherche scientifique. Particulièrement, M. Mourer a bénéficié d'une allocation ministérielle pour son travail de thèse. Nous remercions le Pr Alain Lozniewski (Laboratoire de bactériologie, hôpital central, CHU, Nancy) pour les souches de référence ATCC. Nous remercions vivement Aurélie Ribon et Stéphane Fontanay pour leur aide technique.

Références

- [1] Enquête de prévalence des infections nosocomiales 2001, groupe Raisin, résultats publiés le 28/10/2003, www.invs.sante.fr/surveillance/raisin/.
- [2] Enquête régionale de prévalence des infections nosocomiales, Lorraine, novembre 2004 – Rapporteurs : Tronel H, Vallet G, Tousseul S, Blech MF – Résultats présentés aux XIII^{es} Journées régionales d'hygiène et de lutte contre les infections nosocomiales, 26 et 27 mai 2005.
- [3] Baeyer A. Ueber die Verbindungen der Aldehyde mit den Phenolen. *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft* 1872;5:25–6.
- [4] Baeyer A. Ueber die Verbindungen der Aldehyde mit den Phenolen. *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft* 1872;5:280–2.
- [5] Baeyer A. Ueber die Verbindungen der Aldehyde mit den Phenolen und aromatischen Kohlenwasserstoffen. *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft* 1872;5:1094–100.
- [6] Niederl JB, Vogel HJ. Aldehyde-resorcinol condensations. *J Am Chem Soc* 1940;62:2512–4.
- [7] Gutsche CD, Muthukrishnan R. Calixarenes. 1. Analysis of the product mixtures produced by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with para-substituted phenols. *J Org Chem* 1978;43:4905–6.
- [8] Asfari Z, Böhmer V, Harrowfield J, Vicens J. Calixarenes 2001. The Netherlands: Kluwers Dordrecht; 2001.
- [9] Lumetta GJ, Rogers RD, Gopalan AS. Calixarenes for separations. ACS Symposium; 2000 (Series 757).
- [10] Still WC. Discovery of Sequence-Selective Peptide Binding by Synthetic Receptors Using Encoded Combinatorial Libraries. *Acc Chem Res* 1996; 29:155–63.
- [11] Sansone F, Barbosa S, Casnati A, Fabbi M, Pochini A, Ugozzoli F, et al. Synthesis and Structure of Chiral Cone Calix [4]arenes Functionalized at the Upper Rim with L-Alanine Units. *Eur J Org Chem* 1998;5:897–905.
- [12] Sansone F, Barbosa S, Casnati A, Sciotto D, Ungaro R. A New Chiral Rigid Cone Water Soluble Peptidocalix [4]arene and Its Inclusion Complexes with α -Amino Acids and Aromatic Ammonium Cations. *Tetrahedron Lett* 1999;40:4741–4.
- [13] Okada Y, Kasai Y, Nishimura J. The Selective Extraction and Transport of Amino Acids by Calix [4]arene-derived Esters. *Tetrahedron Lett* 1995; 36:555–8.
- [14] Shinkai S, Mori S, Koreishi H, Tsubaki T, Manabe O. Hexasulfonated Calix [6]arene Derivatives: A New Class of Catalysts, Surfactants, and Host Molecules. *J Am Chem Soc* 1986;108:2409–16.
- [15] Gutsche CD, Alam I. Calixarenes. 23. The Complexation and Catalytic Properties of Water Soluble Calixarenes. *Tetrahedron* 1988;44:4689–94.
- [16] Magrans JO, Ortiz AR, Molins MA, Lebouille PHP, Sanchez-Quesada J, Prados P, et al. A designed non-peptidic receptor that mimics the phosphocholine binding site of the McPC603 antibody. *Angew Chem Int Ed Engl* 1996;35:1712–5.
- [17] Cuevas F, Di Stefano S, Magrans JO, Prados P, Mandolini L, de Mendoza J. Toward an Artificial Acetylcholinesterase. *Chem Eur J* 2000;6: 3228–34.
- [18] Park HS, Lin Q, Hamilton AD. Protein Surface Recognition by Synthetic Receptor: A Route to novel Submicromolar Inhibitors for α -Chymotrypsin. *J Am Chem Soc* 1999;121:8–13.
- [19] Lin Q, Hamilton AD. In: Design and synthesis of multiple-loop receptors based on calix [4]arene scaffold for protein surface recognition. *C. R. Chimie*; 2002. p. 441–50.
- [20] Mecca T, Consoli GML, Geraci C, Cunsolo F. Designed calix [8]arene-based ligands for selective tryptase surface recognition. *Bioorg Med Chem* 2004;12:5057–62.
- [21] Yo T, Fujiwara K, Otsuka M. JP 10203906. 1998.
- [22] a) Harris SJ. WO Patent 9519974, 1995. b) Harris SJ. WO Patent 0244121, 2002.
- [23] Hwang KM, Qi YM, Liu SY, Choy W, Chen J. WO Patent 9403164. 1994.
- [24] Hwang KM, Qi YM, Liu SY, Lee TC, Choy W, Chen J. WO Patent 9403165. 1994.
- [25] Hulmes D, Coleman A, Aubert-Foucher E. (CNRS, Fr) WO patent 0007585. 2000.
- [26] Cornforth JW, Hart PD, Nicholls GA, Rees RJW, Stock JA. Antituberculous effects of certain surface-active polyoxyethylene ethers. *Br J Pharmacol* 1955;10:73–86.
- [27] Cornforth JW, Morgan ED, Potts KT, Rees RJW. Preparation of antituberculous poly(oxyethylene ethers) of homogeneous structure. *Tetrahedron* 1973;29:1659–67.
- [28] Hart PD, Armstrong JA. Calixarenes with host-mediated potency in experimental tuberculosis: further evidence that macrophage lipids are involved in their mechanism of action. *Infect Immun* 1996;64:1491–3.
- [29] Colston MJ, Hailes HC, Stavropoulos E, Hervé AC, Hervé G, Goodworth KJ, et al. Antimycobacterial Calixarenes Enhance Innate Defense Mechanisms in Murine Macrophages and Induce Control of Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. *Infect Immun* 2004;72:6318–23.
- [30] Casnati A, Di Modugno E, Fabbi M, Pelizzi N, Pochini A, Sansone F, et al. Synthesis, Antimicrobial Activity and Binding Properties of calix [4]arene based Vancomycin Mimics. *Bioorg Med Chem Lett* 1996;6: 2699–704.
- [31] Duval RE, Mourer M, Commeny M, Regnouf de Vains JB, Finance C. Developing new anti-infectious strategies: Interest for calixarenes as potent antibacterial drugs. XXVe Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, 1-2 décembre 2005.
- [32] Mourer M, Duval RE, Finance C, Regnouf-de-Vains JB. Functional organisation and gain of activity: The case of the antibacterial tetra-para-guanidinoethyl-calix [4]arene. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16: 2960–3.
- [33] Communiqué CA-SFM. 2006 (Edition janvier 2006). <http://www.sfm.asso.fr>.
- [34] NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A6, 6th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne: Pa, USA; 2003.
- [35] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [36] Harmand PO, Duval R, Delage C, Simon A. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. *Int J Cancer* 2005;114:1–11b.

CHAPITRE II. DES BACTÉRIES...

EVOLUTION & DISSÉMINATION DES RÉSISTANCES

Le traitement des infections bactériennes est rendu de plus en plus complexe du fait de la capacité des bactéries à développer des mécanismes de résistance divers et nombreux aux agents utilisés en thérapeutique. Une bactérie peut présenter une résistance intrinsèque ou naturelle à une ou plusieurs classes d'antibiotiques. Mais elle peut aussi acquérir une résistance par mutation *de novo* ou par l'acquisition de gènes de résistance provenant d'autres organismes. Les gènes acquis peuvent rendre la bactérie capable (i) de produire des enzymes inactivatrices, (ii) d'exprimer des systèmes d'efflux empêchant l'antibiotique d'atteindre sa cible, (iii) de modifier la cible de l'antibiotique, ou (iv) de mettre en place une voie métabolique alternative permettant de passer outre l'action de l'antibiotique.

I. Bactéries à Gram positif et résistances

Les cocci à Gram + sont des causes fréquentes d'infections nosocomiales (IN) ou Infections Associées aux Soins (IAS), en particulier d'endocardites et de septicémies. La dissémination de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) ou Entérocoques résistants aux Glycopeptides (ERG) est particulièrement inquiétante. Les épidémies intra-hospitalières sont typiquement le résultat de l'expansion d'un clone, transféré de patient à patient, ou de façon manuportée par l'intermédiaire du personnel soignant.

1.1. Staphylocoques et résistance à la méticilline

▣ **Emergence et dissémination des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM)**

Staphylococcus aureus est un cocci à Gram + qui colonise la peau d'environ 30 % de la population. Malgré le fait que le portage soit généralement sans conséquence, *S. aureus* peut être responsable d'infections sévères, en particulier de la peau et des tissus mous. Les SARM sont une des causes les plus importantes d'IAS, dans la plupart des pays, en Europe, aux Etats Unis, en Afrique du Nord.

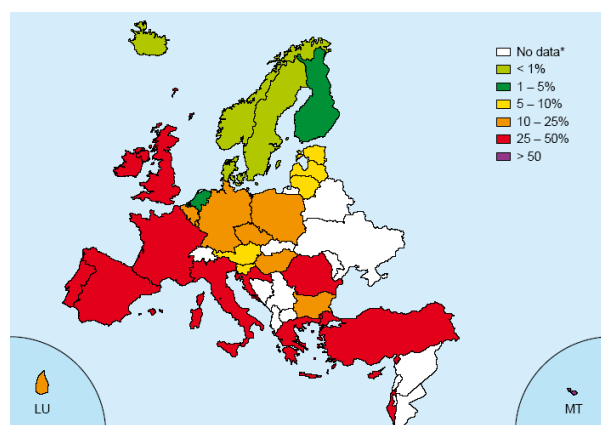


Figure 50 : *Staphylococcus aureus* : fréquence de SARM dans les différents pays d'Europe en 2007, d'après [EARSS 2007].

La pénicilline G a été le 1^{er} antibiotique découvert, et commercialisé dans les années 40. Les 1^{ères} souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline G ont été rapportées en 1944. Alors que la méthicilline était introduite ensuite en Europe en 1959 et aux Etats-Unis en 1961, les 1^{ers} cas de SARM sont apparus au Royaume Uni, en 1961, puis les signalements se sont multipliés en Europe, au Japon et en Australie, pour atteindre les Etats Unis en 1968. Cette dissémination mondiale rapide était due à un usage intensif et abusif de la méthicilline en unités de soins intensifs (USI), pour pallier l'émergence croissante de *S. aureus* résistants à la pénicilline G. Ceci est une illustration très juste de ce qui est, depuis toujours, la course entre l'Homme (et les antibiotiques) et les bactéries. Jusqu'à une prise récente de conscience, ce combat a toujours été en faveur des bactéries, du fait d'une utilisation excessive, inadéquate et non réfléchie des chimiothérapies anti-infectieuses. Selon le dernier rapport du « National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) System », paru en 2004, les souches de SARM représentent 59,5% des *S. aureus* isolés en USI, ce qui correspond à une augmentation de 11% entre 1998 et 2002 [NNIS, 2004]. Un peu plus proche de nous, en Europe, l'« European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) » rapporte pour cette même période, un taux de SARM de 21% avec une grande disparité entre les pays : faible proportion dans les pays d'Europe du Nord (Norvège, Suède, Islande...) (< 3%), taux un peu plus élevé dans les pays d'Europe Centrale (5-25%), et un taux très important, comparable à celui observé aux Etats Unis, en Europe méditerranéenne et au Royaume Uni (30-40%). Une augmentation significative a cependant été observée au Danemark, en Finlande ou aux Pays Bas [EARSS, 2007]. Heureusement, un peu d'optimisme émerge actuellement : pour deux pays, la Slovénie et la France, on observe une diminution consistante ces 5 ou 6 dernières années (de 33% en 2001 à 27% en 2005, pour la France par exemple) (Figure 50). Ces évolutions montrent que la dissémination des SARM n'est pas un phénomène irréversible mais peut être contrôlée par des efforts conjoints d'hygiène et de maîtrise de l'antibiothérapie [EARSS, 2007]. Les principaux facteurs prédisposant à l'acquisition d'un SARM sont : hospitalisation récente, admission en USI, contact avec un patient porteur, chirurgie, traitement antibiotique prolongé.

Un des principaux problèmes lié à la dissémination des SARM est le fait que ces souches sont généralement multirésistantes. Une des dernières souches isolées, au Royaume Uni, nommée EMRSA-17 (EMRSA pour epidemic MRSA), est résistante aux β -lactamines, fluoroquinolones, macrolides, aminosides, tétracyclines, rifampicine, acide fusidique, auxquels s'ajoute une résistance intermédiaire à la teicoplanine [Aucken et al., 2002].

▣ Les SARM communautaires

Parmi les souches de SARM, il est important de distinguer les **SARM communautaires** (CA-MRSA, "Community-Acquired Methicillin-Resistant *S. aureus*") **et hospitaliers** (HA-MRSA, "Hospital-Acquired MRSA"). Il reste cependant difficile d'établir la réelle origine communautaire d'une infection à SARM ; en effet, une colonisation nosocomiale par SARM peut demeurer non détectée, et l'infection peut se produire plusieurs mois après l'hospitalisation. Cela explique l'hétérogénéité des définitions concernant ce qu'est réellement un CA-MRSA. Une définition précise du cas d'isolement d'un CA-MRSA a cependant été donnée en février 2005 par le Center for Disease Control (CDC) : « identification d'un SARM chez un patient présentant des signes et symptômes de l'infection, moins de 48 heures après le début de l'hospitalisation, sans antécédent d'infection ou de colonisation à SARM, sans antécédent d'hospitalisation l'année précédente, et absence de dialyse, chirurgie, cathéter permanent ou tout autre matériel médical » [Maltezou et al., 2006]. Les 1^{ers} cas de CA-MRSA ont été rapportés dans les années 80, longtemps après les cas hospitaliers, en particulier chez les toxicomanes, chez les patients en services de long séjour ou présentant une pathologie chronique. Dans les deux derniers cas, on parle de HCA-MRSA ("HealthCare-Associated MRSA"). Ces isolats sont sensibles à de nombreuses familles d'antibiotiques tels que synergistines, macrolides, cotrimoxazole, tétracyclines et fluoroquinolones, contrairement aux SARM hospitaliers, généralement multirésistants. Cette caractéristique ainsi que l'absence de facteurs de risque clairement identifiés semble indiquer un changement de l'épidémiologie des SARM [Zetola et al., 2005].

Depuis ces premiers cas, la prévalence a fortement augmenté, et ce qui est étonnant, les CA-MRSA se rencontrent **essentiellement chez des patients jeunes, sans facteur de risque**. Les cas les plus fréquents sont rapportés chez des enfants ou des adolescents en bonne santé ; les seuls facteurs de risque retenus sont un traitement antibiotique, la vie en communauté (institutions, prisons, casernes militaires...) ou la pratique d'activités ou sports collectifs (saunas, piscines...). Une étude chez 812 soldats aux Etats Unis pendant 8 à 10 semaines a montré que la colonisation par un CA-MRSA était un facteur de risque d'infection de la peau et des tissus mous ; 38% des soldats étaient porteurs de CA-MRSA et 89% des CA-MRSA isolés exprimaient les gènes de la leucocidine de Panton Valentine (LPV) [Ellis et al., 2004]. Des cas intra-familiaux illustrent parfaitement la possibilité d'une transmission interpersonnelle, et une transmission par l'alimentation a déjà été décrite (épidémie de gastro-entérites à CA-MRSA, [Jones et al., 2002]). Une nouvelle étape a été franchie lorsque les CA-MRSA ont été retrouvés responsables d'infections nosocomiales, en particulier chez les nouveaux-nés et les

femmes en post-partum. Une épidémie dans un service de néonatalogie, d'une durée de 15 mois, impliquant 14 nouveaux-nés (2 décès) a été causée par une souche de CA-MRSA, identique aux souches retrouvées au niveau local, mais différente des souches de SARM multirésistants généralement isolées à l'hôpital. L'incidence était de 18,5 cas pour 1000 hospitalisations contre 1,4 pour la période précédant cette épidémie [Regev-Yochay et al., 2005].

Les CA-MRSA sont responsables dans la plupart des cas d'infections superficielles ou profondes de la peau et des tissus mous : furoncles, abcès, folliculites,... le plus souvent au niveau des extrémités. Ces infections bénignes peuvent être traitées par simple incision et drainage, aucun décès n'a été signalé dans la littérature. Un biais est cependant possible, dû au fait que ces infections sont souvent méconnues et traitées en ville [Maltezou & Giamarellou, 2006].

Le traitement des infections à CA-MRSA est généralement simple, ces souches, à l'inverse des isolats hospitaliers, n'étant généralement pas multirésistantes. En 1^{ère} intention est recommandée la clindamycine, quand incision et drainage ne suffisent pas. Peuvent être utilisés en 2^{ème} intention cotrimoxazole, tétracyclines, moxifloxacine, daptomycine (nouvel antibiotique approuvé par la FDA, en attente d'AMM européenne), linézolide, quinupristine/dalfopristine [Maltezou & Giamarellou, 2006].

☐ SARM et leucocidine de Panton-Valentine (LPV)

Un fait récent inquiétant est l'acquisition par les CA-MRSA des **gènes lukF-PV** et **lukS-PV** codant la leucocidine de Panton Valentine (LPV). Des pathologies plus sévères, à type d'ostéomyélite, orchite, lymphadénite, endocardite ou cholécystite, pouvant aller jusqu'à la pneumonie hémorragique nécrosante, la bactériémie et les abcès multiples (cerveau, poumons, larynx, côlon, foie, reins) sont rencontrées avec ces souches de CA-MRSA sécrétrices de la LPV. Plus de 35% de décès sont notés dans ce cas [Maltezou & Giamarellou, 2006].

La LPV a été découverte en 1984 par Van de Velde, qui l'avait isolé d'une souche de *S. aureus*. Son association à des abcès sévères avait déjà été mise en évidence par Panton et Valentine en 1932. C'est la toxine de *S. aureus* la plus rarement produite (2-5% des souches isolées en France, mais près de 30% des souches africaines). Elle est codée par les gènes lukS-PV et lukF-PV, permettant l'assemblage d'une toxine dite synergohyménotrope, c'est-à-dire composée d'une protéine de classe S et d'une autre de classe F : ces deux protéines agissent en synergie sur les membranes cellulaires. La LPV lyse les polynucléaires et les macrophages humains en formant des pores

transmembranaires, et a une activité nécrotique sur les tissus. Ainsi, elle apparaît comme spécifiquement associée aux syndromes cutanés primitifs staphylococciques. Dans les cas de pneumonie nécrosante, la LPV par son action nécrosante sur les muqueuses trachéales et bronchiques joue probablement un rôle dans l'invasion et la nécrose à l'origine des hémoptysies. La production fréquente et associée de toxines à activité super antigénique (entérotoxines, toxines SEG et SEI surtout) a un rôle probable dans la survenue des chocs ou accessoirement par diminution des défenses anti-staphylococciques liée au phénomène de dysrégulation immunitaire qu'elle entraîne [Gillet et al., 2000].

Une étude de Lina et coll., menée en 1999 en France, a retrouvé l'expression de la LPV chez 93% des souches responsables de furoncles et 85% des souches isolées dans les pneumonies nécrotiques hémorragiques [Lina et al., 1999]. Une étude menée au centre hospitalier de St Brieuc, entre 1999 et 2002, a rapporté des cas groupés d'infection à SARM producteurs de LPV en France, dont la transmission sur plus de 2 ans a été nosocomiale et communautaire. La notion de séjour à l'hôpital dans l'année précédente ou de contact avec un cas nosocomial était retrouvée dans 87% des cas [Daube et al., 2003]. Plus récemment, Francis et coll. ont décrit quatre cas de pneumonie nécrotique survenue chez des adultes en bonne santé. Ils ont retrouvé dans chaque cas une souche de CA-MRSA exprimant la LPV [Francis et al., 2005].

▣ ***Staphylococcus aureus* résistants aux glycopeptides**

La vancomycine a longtemps été le seul traitement utilisable pour le traitement des infections à SARM. L'émergence de *S. aureus* de résistance intermédiaire à la vancomycine (VISA) en 1996 au Japon et entre 1997 et 1999 aux Etats Unis a remis de nouveau en cause les schémas de chimiothérapie anti-infectieuse. Les VISA présentent une CMI comprise entre 8 et 16 mg/L à la vancomycine et le mécanisme de résistance consiste en une augmentation de l'épaisseur de la couche de peptidoglycane [Hiramatsu et al., 1997a ; Hiramatsu et al., 1997b]. Plus récemment, des souches présentant un niveau de résistance élevé (CMI = 64 mg/L), nommées VRSA (Vancomycin-Resistant *S. aureus*), ont été isolées chez 3 patients aux Etats Unis ; en 2009, le nombre total de souches de VRSA décrites s'élève à 7, ce qui est rassurant ; même si la vigilance reste de mise. La résistance implique cette fois le transfert horizontal d'un transposon contenant le gène *vanA*, à partir de souches d'ERG. Le mécanisme exact de transfert n'a pas encore été élucidé.

En 2007, selon les données de l'EARSS, 4 cas confirmés de VISA ont été rapportés, mais aucun cas de VRSA n'a été signalé : un cas en France, un en Irlande et deux aux Pays-Bas [EARSS, 2007].

1.2. Entérocoques et résistance aux glycopeptides

Les entérocoques appartiennent à la flore résidente gastro-intestinale de l'Homme, des autres mammifères, des oiseaux et des reptiles. Lors de la rupture des relations commensales avec l'hôte, les entérocoques peuvent entraîner des infections invasives. Même s'ils sont moins virulents que les autres bactéries à Gram +, les entérocoques peuvent causer divers syndromes cliniques incluant endocardites, bactériémies, méningites, infections urinaires et être associés à des infections telles que péritonites et abcès intra-abdominaux. La majorité des infections cliniques sont causées par *Enterococcus faecalis* (environ 80% cas), suivi par *Enterococcus faecium*. Les données épidémiologiques recueillies ces 20 dernières années ont montré l'émergence d'entérocoques, en particulier *E. faecium*, comme pathogènes responsables d'infections nosocomiales, qui semblent être due à l'expansion d'un clone hospitalier (CC17). L'émergence d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* s'est faite parallèlement à une augmentation de la résistance aux glycopeptides et aux aminosides. Les infections à entérocoques sont difficiles à traiter, non seulement du fait de la multiplication des résistances, mais aussi du fait que ce sont des bactéries « tenaces », avec une grande capacité de dissémination entre patients au sein d'un service hospitalier.

Les glycopeptides ont été commercialisés dans les années 50. D'abord réservés comme traitement de 2^{ème} intention du fait de leur néphrotoxicité et de leur ototoxicité non négligeables, leur usage a connu un regain d'intérêt avec l'apparition des SARM. Les 1^{ères} souches d'ERG sont apparues dans les années 80, leur prévalence connaît une augmentation considérable ces dix dernières années, en particulier liée à un usage excessif de la vancomycine dans les USI aux Etats Unis. Alors que la consommation de glycopeptides reste restreinte en pathologie humaine, en Europe, l'avoparcine, une autre glycopeptide, a connu un usage excessif dans les élevages comme facteur de croissance chez les animaux à partir de la fin des années 70 ; son utilisation a été interdite en 1998, mais l'usage abusif avait déjà fait émergé des résistances.

Selon le rapport du NNIS en 2004, 30% des entérocoques isolés dans les USI aux Etats Unis sont des ERV [NNIS, 2004]. L'EARSS est bien moins alarmant quant à l'état des lieux en Europe : 0,9 % des souches d'*E. faecalis* et 9 % des souches d'*E. faecium* isolées d'infections nosocomiales sont des

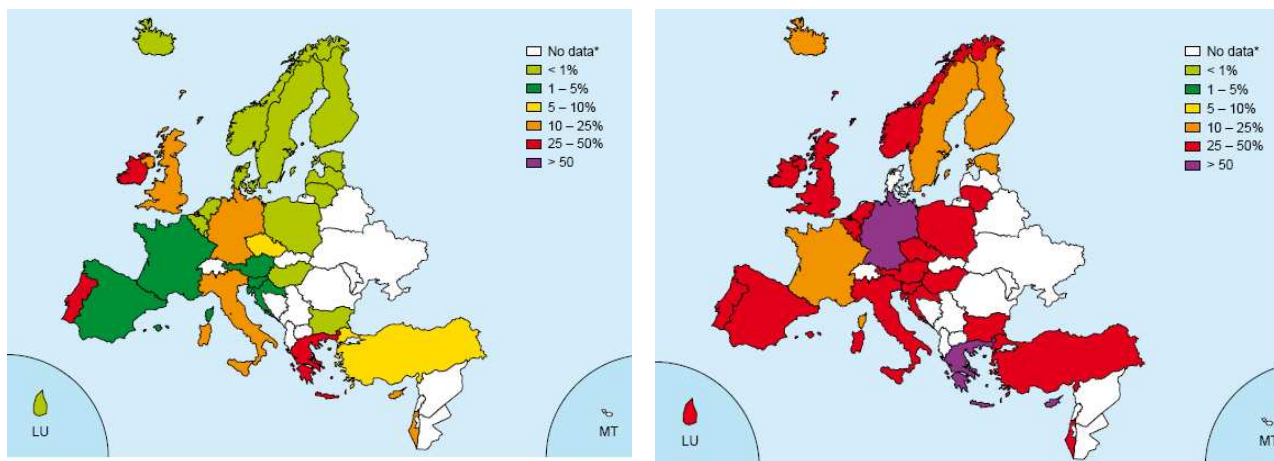


Figure 51 : *Enterococcus faecium* : fréquence de la résistance à la vancomycine (A) et *Enterococcus faecalis* : fréquence de la résistance de haut niveau aux aminosides (B) dans les différents pays européens en 2007, d'après [EARSS, 2007].

ERV [EARSS, 2007]. Dans la plupart des pays, la fréquence de la résistance à la vancomycine est < 1%, exception faite de la Grèce (37%), de l'Irlande (33%), du Portugal (29%), de l'Italie (11%), ou d'Israël (24%) (Figure 51, A). Durant les 4 dernières années, certains pays (Allemagne, Grèce, Irlande, Israël, Slovaquie, Turquie) ont connu une augmentation significative de la résistance aux glycopeptides, cette augmentation correspondant généralement à des épidémies hospitalières [EARSS, 2007]. Les rapports les plus récents concernant les Etats Unis sont particulièrement alarmants puisque certains auteurs font état de plus de 70% de ERG parmi les entérocoques isolés d'hémocultures, dans certains services hospitaliers [Karlowsky et al., 2004]. La résistance des entérocoques aux glycopeptides est liée à l'expression de gènes *van*, entraînant la synthèse de précurseurs pentapeptidiques DAla-DLac au lieu des pentapeptides DAla-DAla, empêchant la liaison des glycopeptides. Différents antibiotiques peuvent être responsables de la sélection des ERG, en particulier les C₃G et les antibiotiques anti-anaérobies tels que les 5-nitro-imidazolés [Donskey et al., 2000].

Concernant la résistance à haut niveau aux aminosides, la fréquence est très variable selon les pays européens : de 13% en Islande à 67% en Allemagne ! La majorité des pays se situent entre 25 et 50%, à l'exception de la France (15%), de la Suède (16%) et de l'Estonie (23%) (Figure 51, B) [EARSS, 2007].

1.3. Pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP)

Streptococcus pneumoniae est une cause fréquente d'infection, essentiellement chez les jeunes enfants, les patients âgés et les sujets immunodéprimés. L'expression clinique est variable allant d'infections des voies aériennes supérieures (sinusite, otite moyenne) à des infections plus graves telles que pneumonie franche lobaire aiguë, méningite, septicémie. *S. pneumoniae* est la cause majeure de pneumonie dans le monde, impliquant une morbidité et une mortalité élevées. La mortalité est plus élevée dans les populations à faible niveau socio-économique et environ 1/3 des décès surviennent chez les enfants de moins de 5 ans.

S. pneumoniae possède une large variété de facteurs de virulence qui facilitent l'adhérence et l'invasion des tissus hôtes. Le plus important facteur de virulence est sa **capsule polysaccharidique**, protégeant la bactérie de la destruction par le système immunitaire. Environ **80 sérotypes** ont été décrits ; la distribution des sérotypes dans la population varie avec l'âge, la pathologie et la région

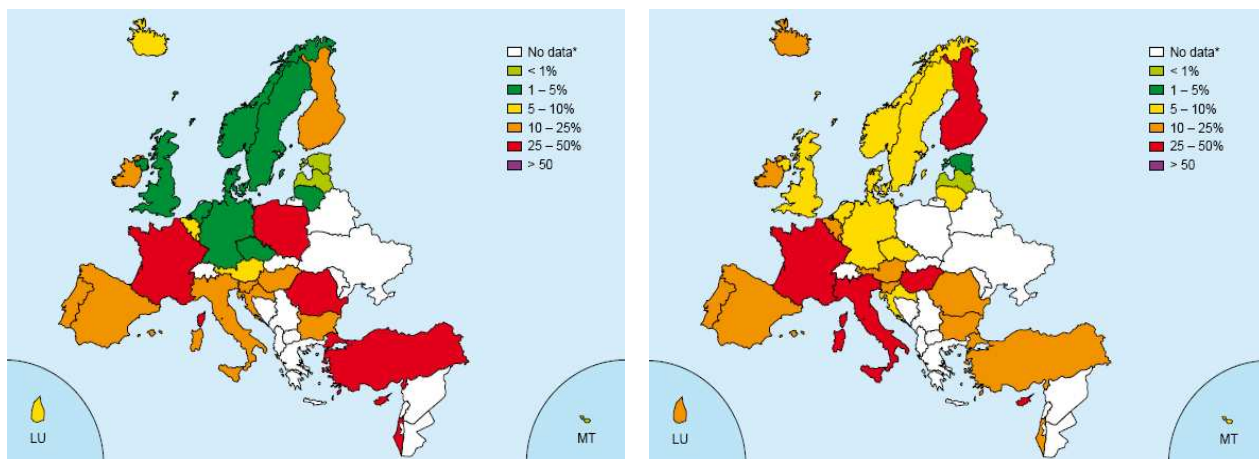


Figure 52 : *Streptococcus pneumoniae* : fréquence de la résistance aux β -lactamines (PSDP) (A) et à l'érythromycine (B) en 2007, d'après [EARSS, 2007].

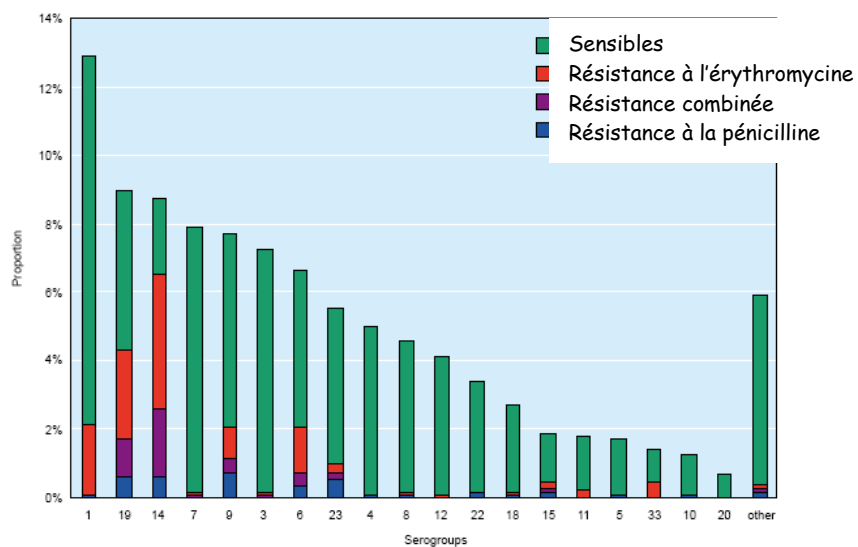


Figure 53 : Distribution des sérogroupes et des profils de résistance (β -lactamines seules, MLS seules, les deux conjuguées), d'après [EARSS, 2007].

géographique. De façon intéressante, les sérotypes les plus souvent impliqués dans les pathologies infantiles sont ceux présentant le plus fréquemment une résistance aux antibiotiques. Les résistances les plus généralement retrouvées chez *S. pneumoniae* sont les résistances aux β -lactamines et au groupe macrolides-lincosamides-synergistines (MLS).

Le mécanisme de résistance aux β -lactamines chez *S. pneumoniae* consiste en une altération des PLP, entraînant une affinité diminuée aux β -lactamines. Ces **pneumocoques, dits de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP)** ont une prévalence très variable selon les pays d'Europe : de 1% aux Pays Bas, à 26% en France ou 39% en Roumanie. Certains pays ont rapporté une augmentation significative : Islande (2,1% en 1999 contre 8,1% en 2005), Bulgarie (8% en 2002 contre 32,6% en 2005) (Figure 52) [EARSS, 2007]. La résistance aux β -lactamines est confinée à quelques sérogroupes (6, 9, 14, 19, 23) et totalement absente du sérotype le plus fréquent, le sérotype 1 ; la résistance à l'érythromycine est observée chez les sérogroupes 1, 14 et 19 essentiellement (Figure 53) [EARSS, 2007]. De façon intéressante, l'ensemble des sérogroupes comprenant des isolats résistants sont inclus dans le vaccin heptavalent, à l'exception du sérotype 33 relativement rare. Il est donc à espérer que l'introduction de ce vaccin dans la liste des vaccinations recommandées chez l'enfant dans de nombreux pays européens aura un impact sur le contrôle de la résistance aux antibiotiques chez *S. pneumoniae*.

Deux mécanismes de résistance aux MLS ont été rapportés : (i) l'acquisition des gènes *erm*, résultant en une modification post-transcriptionnelle de l'ARN 23S, empêchant la liaison des macrolides aux ribosomes ; (ii) l'acquisition d'un système d'efflux (gène *mefE*). Contrairement à la résistance aux β -lactamines, la résistance aux MLS *via* ces mécanismes est absolue, ne pouvant être contournée par une augmentation des posologies. En 2007, la majorité des pays européens a rapporté une prévalence de 10 à 25% de la résistance à l'érythromycine. Cinq pays ont signalé une résistance supérieure à 25% des isolats : Chypre, Finlande (26%), France (37%), Hongrie (36%) et Italie (31%) [EARSS, 2007]. La résistance conjuguée aux β -lactamines et aux MLS est d'environ 5% quelque soit le pays, mais atteint des taux inquiétants en France (29%) et à Chypre (20%) [EARSS, 2007].

II. Bactéries à Gram négatif et résistances

2.1. Entérobactéries, BLSE et résistance aux fluoroquinolones

Les Entérobactéries sont des bacilles à Gram-, cause importante d'infections urinaires, de septicémies, d'infections intra-abdominales et de pneumopathies nosocomiales (en particulier chez les patients immunodéprimés). *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., et *Enterobacter* spp. sont les espèces les plus fréquemment isolées en pathologie humaine, et sont celles le plus souvent impliquées dans les infections nosocomiales. L'émergence de résistance chez les Entérobactéries est un problème nécessitant toute notre attention. Ainsi, la dissémination de souches productrices de **BLSE (β -lactamase à Spectre Etendu)** prend de l'importance, s'accompagnant d'une diversification de type des BLSE, avec, par exemple, l'apparition récente des BLSE de type CTX-M chez *E. coli*. Ce problème s'étend à la fois aux mondes hospitalier et communautaire.

▣ β -lactamases et BLSE

Le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines est l'existence de β -lactamases hydrolysant le cycle β -lactame. Chez *E. coli*, la résistance est généralement conférée par des β -lactamases plasmidiques, de types TEM ou SHV ; ainsi, chez *E. coli*, TEM-1 est responsable d'environ 60% des résistances aux aminopénicillines. Les C₃G ont été développées dans un premier temps comme des agents stables à l'hydrolyse des β -lactamases, afin de pallier à ce type de résistance. Dans les années 80, sont apparues des enzymes dérivant des pénicillinases à spectre restreint (de type SHV, TEM ou OXA par exemple) capables d'inactiver les C₃G et nommées pour cette raison **β -Lactamase à Spectre Etendu ou BLSE**, pour la 1^{ère} fois par Philippon et coll. en 1989 [Philippon et al., 1989]. La 1^{ère} BLSE a été décrite en Allemagne, en 1983, et était de type SHV-1 [Shah & Stille, 1983]. Sont apparues ensuite, en France, des BLSE de type TEM-1 et TEM-2. Actuellement, plus de 200 variants de BLSE sont connus. Il a été compris assez récemment qu'une ou plusieurs substitutions d'acides aminés dans la structure de base pouvaient modifier leur spectre d'activité et augmenter leur capacité d'hydrolyse, incluant les C₃G ou les carbapénèmes. Les gènes codant les BLSE sont généralement retrouvés sur des plasmides porteurs de gènes de résistance aux aminosides, sulfamides, en association à des mutations conférant un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones.

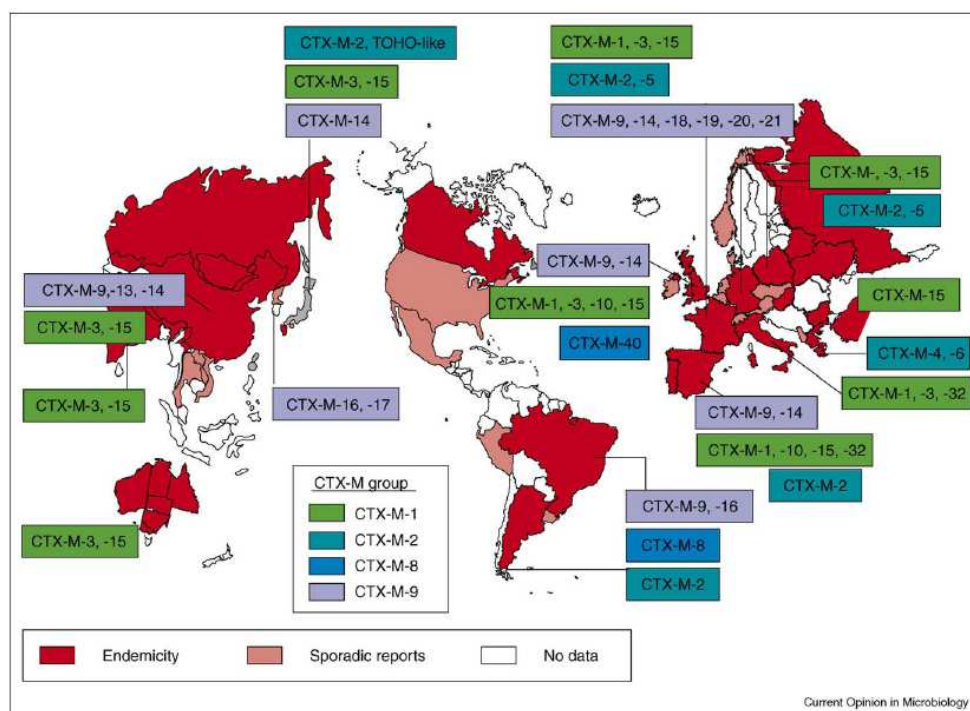


Figure 54 : Répartition géographique mondiale des différentes BLSE de type CTX-M en 2006, d'après [Canton et al., 2006].

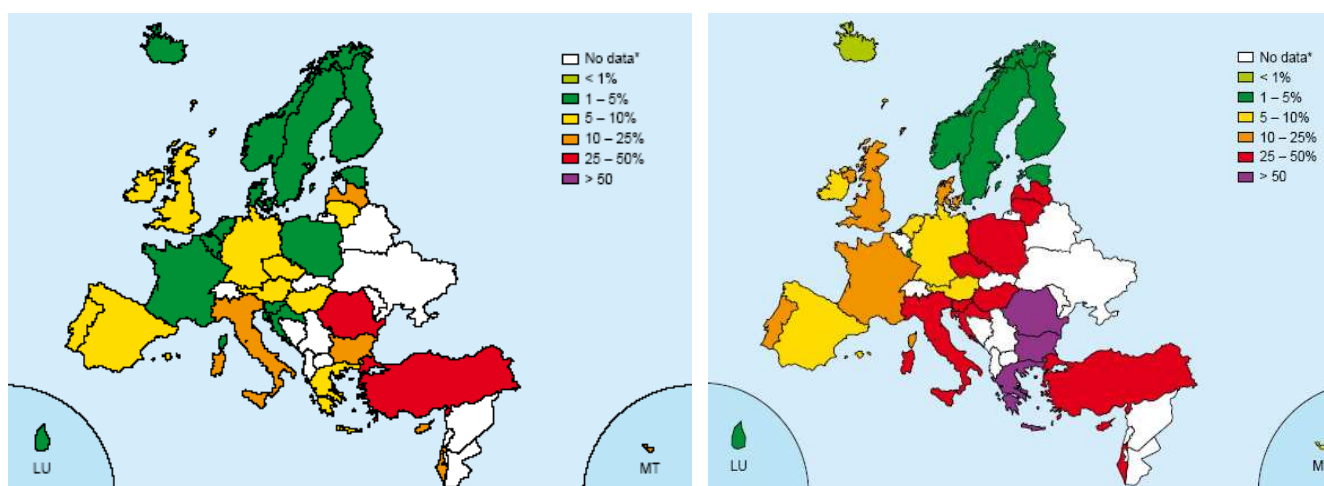


Figure 55 : Fréquence de la résistance aux C₃G dans les différents pays européens en 2007. A : *E. coli* ; B : *K. pneumoniae*, d'après [EARSS, 2007].

Jusqu'à la fin des années 90 les BLSE étaient issues en majorité des β -lactamases de classe A (TEM-1, TEM-2, SHV-1) qui sont fréquemment exprimées chez les bacilles à Gram – et qui confèrent la résistance à : ampicilline, amoxicilline et C₁G. Ce n'est qu'à la fin des années 80 que les 1^{ères} BLSE de type CTX-M ont été décrites en Allemagne et en Argentine [Canton & Coque, 2006]. Les CTX-M demeuraient rares, à l'exception d'épidémies CTX-M-4 et 5, chez *S. typhimurium*, en Russie et en Biélorussie dans le milieu des années 90. Le contexte de dissémination des BLSE a dramatiquement changé ces dernières années, avec un remplacement des TEM et SHV, auparavant prédominantes en Europe, par des enzymes de type CTX-M. *E. coli* est devenu l'hôte majeur de ces enzymes, et ces bactéries sont isolées fréquemment chez des patients communautaires [Canton & Coque, 2006]. A l'heure actuelle, une cinquantaine de CTX-M ont été identifiées. Une caractéristique remarquable est la spécificité de certaines CTX-M à certains pays ; notons, par exemple, CTX-M-9 et 14 en Espagne, CTX-M-1 en Italie ou CTX-M-2 en Amérique du Sud, Japon et Israël. Alors que d'autres, comme la CTX-M-15, ont une dissémination mondiale. La répartition mondiale des différents types de CTX-M est présentée Figure 54 [Canton & Coque, 2006].

Ces enzymes confèrent chez les Entérobactéries, un plus haut niveau de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone) et à l'aztréonam, qu'à la ceftazidime (qui reste généralement active). Certaines enzymes peuvent évoluer vers un plus haut niveau de résistance à la ceftazidime ; les CTX-M-15 et 32 par exemple, ont une activité 100 fois plus importante que les autres sur la ceftazidime [Philippon & Arlet, 2006 ; Livermore et al., 2006]. Elles n'hydrolysent pas les céphamycines, la témocilline et les carbapénèmes, et sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases.

Aux Etats-Unis, le NNIS rapporte une résistance aux C₃G chez 20,6% des souches de *K. pneumoniae*, 31,1% *Enterobacter* spp. et 5,8% *E. coli* dans les USI. Cela correspond pour *K. pneumoniae* à une augmentation de 47% depuis 1998 ! [NNIS, 2004]. Selon l'EARSS, la fréquence de la résistance aux aminopénicillines chez *E. coli* est importante (environ 30%), quelque soit le pays d'Europe considéré, et cette résistance augmente de façon significative depuis 2001 [EARSS, 2007]. La résistance aux C₃G chez *E. coli* est présente chez moins de 5% des souches en 2005 (Figure 55, A). Par comparaison, la situation est beaucoup plus préoccupante pour *K. pneumoniae*. Ainsi, dans certains pays, plus de 2/3 des souches présentent une résistance aux C₃G : Grèce 62%, Roumanie 80%, République Tchèque 46%, Bulgarie 55% (Figure 55, B) [EARSS, 2007].

▣ BLSE communautaires

Les BLSE sont généralement isolées dans les hôpitaux, mais il existe maintenant une évidence selon laquelle ces souches sont apparues et se sont disséminées dans la communauté. De même que pour les SARM, on parle de **CA-BLSE** pour **Community-Acquired BLSE**. Le plus souvent, les CA-BLSE sont impliquées dans des infections urinaires, mais aussi dans des infections gastro-intestinales. Le cas clinique typique d'une infection associée à une CA-BLSE est une infection urinaire ($\pm$ bactériémie), due à une souche *E. coli* CTX-M chez une femme âgée avec de nombreux ATCD d'infections urinaires. Les isolats sont généralement résistants aux antibiotiques utilisés en 1^{ère} ligne dans les infections urinaires, tels que ciprofloxacine ou triméthoprim-sulfaméthoxazole. Une étude espagnole [Rodriguez-Bano et al., 2004] et une étude israélienne [Colodner et al., 2004] ont recherché les facteurs de risque de telles infections et ont retenu les critères suivants : diabète, traitement antibiotique <3 mois (fluoroquinolones, C₂G, C₃G, pénicillines), antécédents d'hospitalisation <3 mois, âge >60 ans, sexe masculin.

Un autre fait inquiétant est l'isolement de pathogènes producteurs de BLSE impliqués dans des infections gastro-intestinales communautaires. Les espèces responsables rapportées sont les suivantes : *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* et *E. coli* sécréteurs de shigatoxine (ECET pour *E. coli* entérotoxigènes). Des BLSE de type TEM, SHV, ou CTX-M ont été décrites chez *Salmonella* spp., ainsi que des β -lactamases de type AmpC. Ceci est inquiétant du fait que les C₃G restent le traitement de choix de ce type de pathologie, en particulier chez les enfants, pour lesquels les fluoroquinolones sont contre-indiquées.

▣ Carbapénémases

Le traitement de choix des infections causées par des Entérobactéries sécrétrices de BLSE est l'administration de carbapénèmes. Une étude sur les pneumonies nosocomiales a montré 100% d'amélioration clinique chez les patients sous imipénème, contre 69% sous céfépime [Zanetti et al., 2003]. Cependant, des β -lactamases hydrolysant les carbapénèmes sont aussi apparues, on parle de **carbapénémases**, qui sont le plus souvent des métallo- β -lactamases. De la même façon que les BLSE, les carbapénémases hydrolysent les C₃G, mais sont aussi, dans ce cas, actives sur les carbapénèmes et les céphamycines, et sont résistantes aux IBL. Les souches productrices de KPC

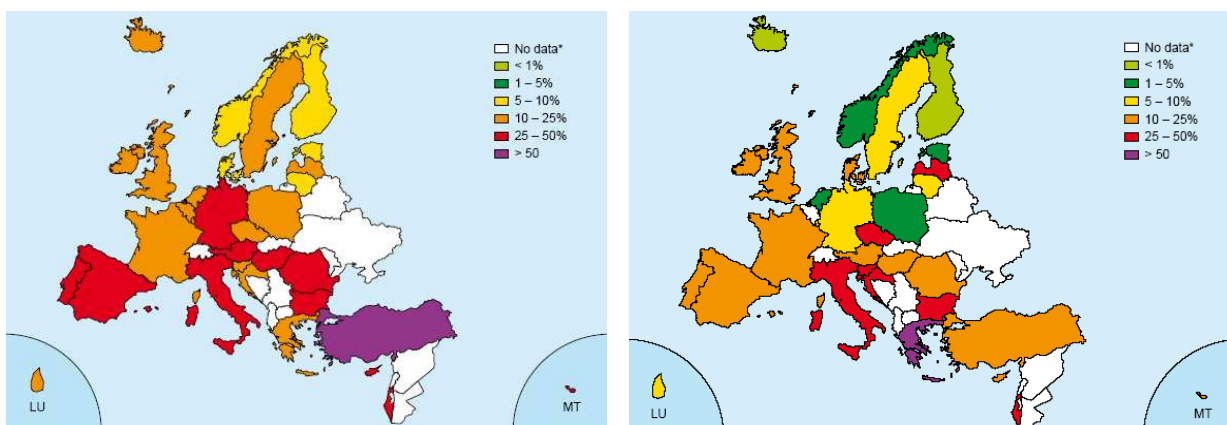


Figure 56 : Fréquence de la résistance aux fluoroquinolones dans les différents pays européens en 2007. A : *E. coli* ; B : *K. pneumoniae*, d'après [EARSS, 2007].

(*K. pneumoniae* Carbapénémase) sont généralement multirésistantes : pipéracilline-tazobactam, C₃G, C₄G, fluoroquinolones, aminosides [Philippon & Arlet, 2006].

Les données sur la résistance aux carbapénèmes, évaluée uniquement pour *K. pneumoniae*, sont issues d'un rapport volontaire de chaque pays à l'EARSS. Les chiffres sont plutôt rassurants : la résistance demeure <1% dans la plupart des pays d'Europe (à l'exception d'Israël (22%) et de la Grèce (42%)) [EARSS, 2007]. Le traitement de choix des infections liées à ces souches est alors la colistine, ou la tigécycline, nouvel antibiotique, seul représentant de la classe des glycylcyclines.

▣ Entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones

La résistance aux fluoroquinolones survient généralement par modification au niveau des sous-unités des ADN gyrase (*gyrA*, *gyrB*) et topoisomérase IV (*parC*). Une résistance à bas niveau peut être médiée par des changements membranaires (porines, pompes d'efflux). Récemment, il a été montré qu'un mécanisme médié par un gène *qnr* plasmidique, entraîne une protection du complexe ADN-gyrase, empêchant ainsi la liaison des quinolones ; ce mécanisme est inquiétant car fréquemment associé aux enzymes de type CTX-M ou CMY.

Concernant *E. coli*, la résistance aux fluoroquinolones a considérablement augmenté durant ces cinq dernières années, quelque soit le pays d'Europe. Dans certains pays, cette résistance concerne près d'un tiers des souches : Chypre 40%, Turquie 53% par exemple. Les pays du Nord de l'Europe sont une fois de plus les moins touchés. Pour *K. pneumoniae*, la situation est comparable à celle observée pour les C₃G : une faible fréquence dans les pays d'Europe du Nord (Finlande 1%), et une proportion beaucoup plus inquiétante dans les pays d'Europe de l'Est et du Sud (Bulgarie 41%, Grèce 55%) (Figure 56) [EARSS, 2007]. Aux Etats-Unis, près de 11% des souches de *K. pneumoniae* possédait une résistance aux fluoroquinolones médiée par le gène *qnr* [NNIS, 2004].

La résistance combinée à plusieurs classes d'antibiotiques (aminopénicillines, C₃G, aminosides, fluoroquinolones) est d'occurrence fréquente, avec parfois une co-résistance à ces 4 classes. Chez *K. pneumoniae*, le phénotype le plus fréquent est une résistance combinée C₃G + fluoroquinolones + aminosides (14% des souches). Cela suggère que la majorité des isolats sont porteurs de plasmides combinant plusieurs déterminants de résistance [EARSS, 2007].

Une étude américaine, par PCR multiplex, a porté sur 313 isolats cliniques d'Entérobactéries avec une sensibilité diminuée à la ceftazidime et un bas niveau de résistance à la ciprofloxacine. Ils ont

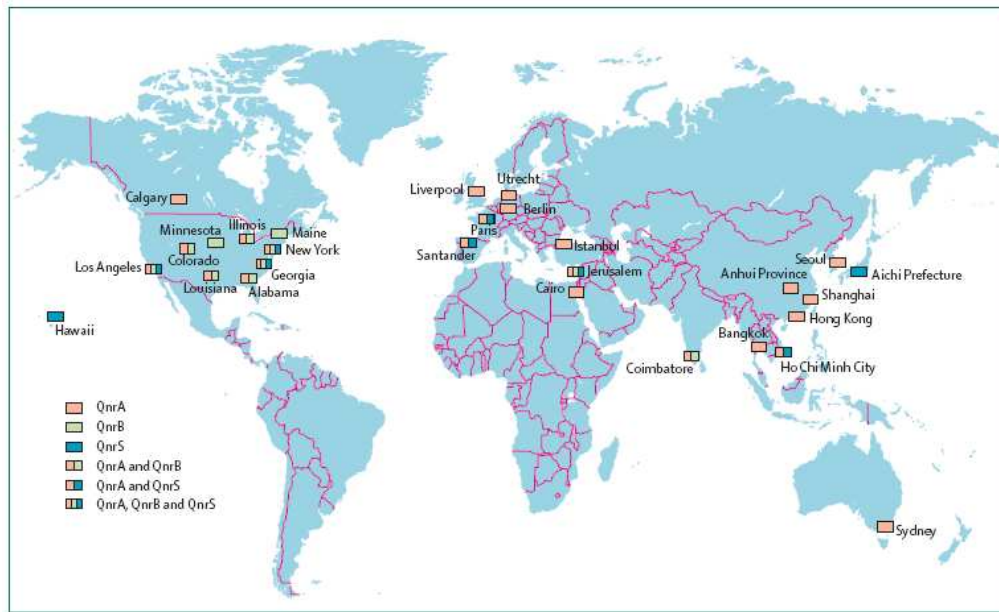


Figure 57 : Répartition géographique mondiale des différents gènes *qnr*, d'après [Robicsek et al., 2006].

montré une prévalence des gènes *qnr* de 4% chez *E. coli*, 20% chez *K. pneumoniae* et 31% chez *Enterobacter* spp. Les gènes *qnrA* et *qnrB* ont été retrouvés en proportion similaire, aucun gène *qnrS* n'a été identifié. Un changement de prévalence a été observé pendant la période de surveillance (1999 à 2004), avec une augmentation de la résistance de type *qnrB* chez *Enterobacter* spp. [Robicsek et al., 2006].

Une étude récente a décrit les 1^{ères} souches d'*Escherichia coli* porteuses de ce gène en Europe. La prévalence du gène *qnr* chez ces souches résistantes à l'acide nalidixique a été retrouvée à seulement 0,3%. Le déterminant Qnr seul ne semble pas suffisant pour entraîner la résistance aux fluoroquinolones ; dans cette étude, il a été retrouvé associé à une substitution Ser83Leu au niveau de l'ADN chromosomique codant *gyrA* [Mammeri et al., 2005]. Diverses études ont montré que 0,2 à 17% des souches résistantes aux fluoroquinolones possèdent le gène *qnr*, et que ce sont essentiellement des Entérobactéries, toutes productrices de BLSE. La répartition mondiale des divers types de gènes *qnr* est présentée Figure 57.

2.2. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Burkholderia* spp. et multirésistance

Les espèces le plus fréquemment isolées en clinique sont : *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia*. Ce sont des bactéries ubiquitaires dans la nature, dans le sol et l'eau. En milieu hospitalier, elles sont généralement isolées d'humidificateurs, de dispositifs de ventilation et d'intubation, ainsi que sur la peau du personnel soignant. Ces pathogènes opportunistes sont responsables d'infections chez les sujets immunodéprimés ou fragilisés. Ainsi, ils sont fréquemment responsables d'infections de la peau et des tissus mous (surinfection d'escarre ou d'ulcère variqueux, surinfection chez les grands brûlés, folliculite...), de complications pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose (localisation pulmonaire chronique), d'exacerbations de pathologies pulmonaires telles que bronchiolite ou BPCO. Du fait de leur ubiquité, de leur formidable capacité d'adaptation et de leur tolérance intrinsèque à un grand nombre de détergents, désinfectants et autres composés antibactériens, il est difficile d'éradiquer ces bactéries de l'environnement hospitalier. Les bactéries à Gram – non fermentant sont naturellement résistantes à de nombreuses familles d'antibiotiques : certaines β -lactamines

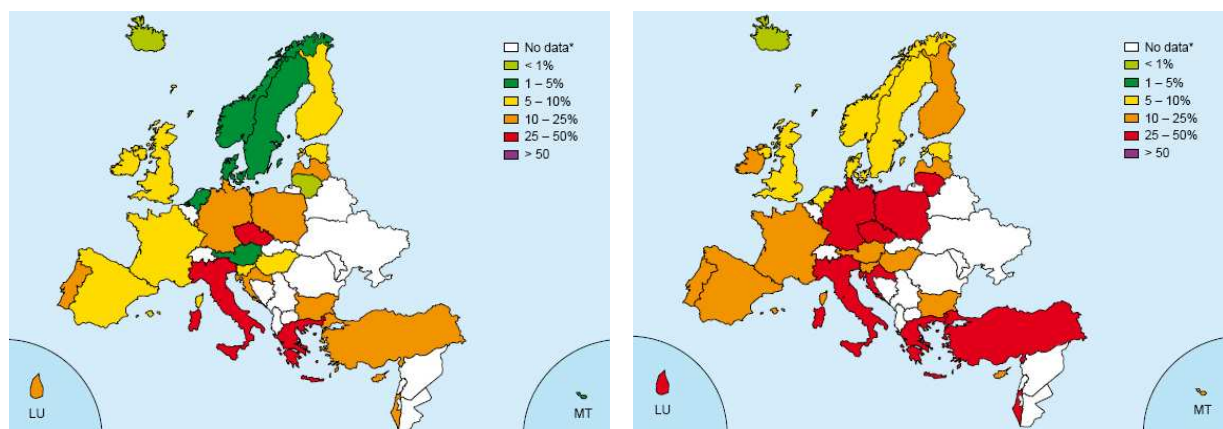


Figure 58 : *P. aeruginosa* : Fréquence de la résistance dans les différents pays européens en 2005.

A : ceftazidime ; B : fluoroquinolones, d'après [EARSS, 2007].

(ampicilline, céphalosporines), macrolides, minocycline... en particulier du fait d'une imperméabilité membranaire ; ainsi, la perméabilité est 10 à 100 fois inférieure à celle d'*E. coli*.

▣ *Acinetobacter baumannii*

Pathogène peu fréquemment impliqué dans les IAS, *A. baumannii* est cependant responsable d'épidémies intra-hospitalières, du fait de sa grande résistance intrinsèque. Le rapport 2004 du NNIS a montré une augmentation de la fréquence d'isolement de cette bactérie dans les épisodes de pneumonie en USI : 4% en 1986, contre 7% en 2003, alors que les infections dues à d'autres bacilles à Gram – sont restées stables durant cette même période [NNIS, 2004]. Une étude du CDC, en 2004, chez des militaires au retour d'Afghanistan, a souligné une résistance des isolats >70% à l'association pipéracilline-tazobactam, au céfépime et à la ciprofloxacine, une résistance de 20 à 54% à l'amikacine et de 15% à l'imipénème [CDC, 2004]. Ceci est inquiétant, ces deux derniers agents étant généralement utilisés en dernière intention.

▣ *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est le 2^{ème} pathogène plus fréquent retrouvé dans les USI aux Etats-Unis, et le 2^{ème} impliqué dans les pneumonies nosocomiales et les infections de la peau et des tissus mous. En France, ce pathogène arrive en 3^{ème} ligne des bactéries isolées d'IN (10%), derrière *E. coli* et *S. aureus* [Coignard et al., 2007]. Aux Etats Unis, une augmentation assez dramatique de la résistance de *P. aeruginosa* a été observée en 2003, par comparaison à la période 1999-2002 : +20% pour la résistance aux C₃G, pipéracilline, ticarcilline, +15% pour la résistance à l'imipénème, +9 % pour la résistance aux fluoroquinolones [NNIS, 2004]. Près de 30% des souches isolées sont résistantes à au moins quatre antibiotiques, incluant ceftazidime, imipénème, gentamicine, ciprofloxacine et lévofloxacine [NNIS, 2004].

En Europe, l'évolution est assez similaire. La résistance à la ceftazidime est similaire à celle de la pipéracilline, avec des taux <10% dans la plupart des pays européens, à l'exception des pays du sud de l'Europe. Ainsi, certains pays ont des taux de résistance supérieur ou égal à 25% : République Tchèque 33%, Grèce 40%, Italie 25% (Figure 58, A) [EARSS, 2007]. Pour les carbapénèmes, l'analyse est plus compliquée, tous les pays différant dans leurs pratiques de routine : test de

l'imipénème ou du méropénème. L'EARSS, par souci de simplification, a combiné l'évaluation de ces deux carbapénèmes. La plupart des pays rapportent une résistance aux carbapénèmes supérieure à 10%, avec des taux allant jusqu'à 47% en Grèce ! [EARSS, 2007].

Concernant la résistance aux fluoroquinolones, un tiers des pays rapportent une résistance supérieure à 25%, à l'exception des pays d'Europe du Nord où la résistance est <5% (Islande 0%, Pays Bas 5%) (Figure 58, B) [EARSS, 2007].

Cette émergence de la multirésistance a relancé l'intérêt de la polymyxine B et de la colistine. Cependant, les 1^{ères} souches résistantes à la polymyxine B ont été décrites en 2005 [Landman et al., 2005]. Des études *in vitro* ont montré l'intérêt des associations polymyxine B / rifampicine ou imipénème, mais aucune preuve d'efficacité clinique n'a été apportée jusqu'alors.

CHAPITRE III. ET DES HOMMES ?...

UN POINT SUR LES INFECTIONS NOSOCOMIALES.

I. Définitions

Les Infections Nosocomiales (IN) sont les infections contractées dans un établissement de santé. Elles sont désormais intégrées dans le groupe plus large des Infections Associées aux Soins (IAS). Une infection est considérée comme IAS si elle survient au cours ou au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient, et si elle n'était ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge [IN, 2009]. Lorsque l'état infectieux au début de la prise en charge n'est pas connu précisément, un délai d'au moins 48 h ou un délai supérieur à la période d'incubation est couramment accepté pour définir les IAS. Pour les Infections du Site Opératoire (ISO), on considère habituellement comme associées aux soins les infections survenant dans les 30 j suivant l'intervention, ou dans l'année dans le cas de la pose d'une prothèse ou d'un implant [IN, 2009].

Le critère principal définissant une IAS est constitué par la délivrance d'un acte ou d'une prise en charge de soins au sens large, par un professionnel de santé ou le patient ou son entourage, encadrés par un professionnel de santé.

1.1. Origines

Ces infections peuvent être directement liées aux soins dispensés au patient (infection sur cathéter ou sur prothèse), ou simplement survenir lors de l'hospitalisation, indépendamment de tout acte médical (épidémie de grippe). On distingue ainsi différentes IAS selon leur mode de transmission :

- infections d'origine « endogène » : le malade s'infecte avec ses propres micro-organismes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière ;
- infections d'origine « exogène » : les micro-organismes ont pour origine les autres malades (transmission croisée ou manuportée par le personnel soignant ou par l'intermédiaire du matériel médical), les personnels ou la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, alimentation, équipements...).

1.2. Facteurs favorisants

Quel que soit son mode de transmission, la survenue d'une infection nosocomiale est favorisée par la situation médicale du patient :

- âge : sont particulièrement réceptifs les nouveaux-nés, les personnes âgées (déficit physiologique du système immunitaire) ;
- pathologie : les patients immunodéprimés, les polytraumatisés ou les grands brûlés sont particulièrement à risque du fait de leur grande fragilité ;
- traitements : antibiotiques (déséquilibre de la flore), immunosuppresseurs ;
- actes invasifs : sondage urinaire, pose d'un cathéter, ventilation artificielle, intervention chirurgicale...

II. Enquêtes de prévalence

Trois enquêtes nationales de prévalence (ENP) des IN ont été réalisées en 1996, 2001 et 2006 par le Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN), instance créée afin de coordonner les actions menées dans le cadre de la lutte contre les IN.

L'ENP de 2006 a été menée un jour donné, incluant tous les services d'hospitalisation, et tous les patients hospitalisés depuis moins de 24 h dans 2337 établissements de soins (soit 95% des lits d'hospitalisation en France). Cette enquête a retrouvé une prévalence des IN de 4,97% (1 patient hospitalisé sur 20), soit une baisse moyenne de 8% par rapport à 2001, si l'on compare les établissements ayant participé aux deux enquêtes de 2001 et 2006 [Coignard et al., 2007]. La prévalence des patients infectés varie selon le type d'établissement de santé (plus élevée dans les CHU et centres de lutte contre le cancer) et les caractéristiques des patients (plus élevée chez les patients âgés, de sexe masculin, atteints d'une maladie sévère, immunodéprimés, opérés ou exposés à un acte invasif : sonde urinaire, cathéter vasculaire ou intubation/trachéotomie) [Coignard et al., 2007].

La prévalence observée en France est dans les limites basses mesurées lors d'enquêtes multicentriques réalisées dans différents pays européens depuis 2000 : Italie 4,9% [Liziolia et al., 2000], Suisse 7,2% [Sax & Pittet, 2005], Finlande 8,5% [Lytkainen et al., 2005], Angleterre 7,6%

[Anonyme, 2006]. Ces comparaisons ne sont qu'indicatives puisque les méthodologies de réalisation des enquêtes sont différentes.

Trois localisations représentaient 59% des IN : infection urinaire (30%), pneumopathie (15%), infection du site opératoire (14%). Les trois bactéries le plus fréquemment isolées étaient : *E. coli* (25%), *S. aureus* (19% dont 52% étaient résistants à la méticilline), et *P. aeruginosa* (10%). Les principaux microorganismes isolés d'IN sont similaires à ceux de 2001, à l'exception notable de *Clostridium difficile* qui apparaît et représente en 2006, 1,1% des microorganismes isolés d'IN. Cette écologie est similaire à celle des enquêtes européennes [Sax & Pittet, 2005 ; Lytikainen et al., 2005]. Parmi les microorganismes testés pour leurs caractéristiques de résistance aux antibiotiques, 24,9% des souches de *Pseudomonas* et apparentés étaient résistantes à la ceftazidime et 14,9% des Entérobactéries étaient de sensibilité intermédiaire ou résistantes au cefotaxime ou à la ceftriaxone. Parmi les Entérocoques, 7,3% des *Enterococcus faecium* et 2,4% des *Enterococcus faecalis* étaient résistants à la vancomycine [Coignard et al., 2007].

Les traitements antibiotiques étaient-ils bien conduits ? Qu'en est-il de la consommation en antibiotiques ? Le jour de l'enquête, 15,88% des patients recevaient un traitement anti-infectieux. Les pénicillines, les C3G, et les fluoroquinolones étaient les familles les plus fréquemment prescrites et représentaient près de 2/3 (62,3%) de l'ensemble. L'association amoxicilline-acide clavulanique était l'antibiotique le plus prescrit (20,3%), puis venaient l'ofloxacine (8,2%), l'amoxicilline (6,8%), la ceftriaxone (6,6%) et la ciprofloxacine (5,9%). Ces 5 molécules représentaient presque la moitié (47,9%) de l'ensemble des molécules prescrites un jour donné [Coignard et al., 2007].

En conclusion, les progrès médicaux permettent de prendre en charge des patients de plus en plus fragiles qui cumulent souvent de nombreux facteurs de risque. La prévention des IAS est complexe car la plupart d'entre elles surviennent du fait de la conjugaison d'un grand nombre de facteurs, et que les bactéries isolées, sont souvent résistantes à de nombreux antibiotiques classiquement utilisés. La résistance aux antibiotiques est un problème persistant et évolutif, que ce soit chez les bactéries à Gram- ou à Gram+. La pression de sélection par les antibiotiques est un facteur important dans l'apparition et la dissémination de ces résistances. Une amélioration des pratiques professionnelles ainsi que la mise en place d'une antibiothérapie concertée et raisonnée sont nécessaires afin d'enrayer ce phénomène. Le lavage des mains par solutés hydro-alcooliques (SHA) a par exemple démontré ses preuves dans la réduction des épidémies à SARM ; des mesures d'isolement, plus ou moins strictes, des patients porteurs sont aussi indispensables. A cela s'ajoute la toxicité non négligeable des dernières thérapeutiques restant à notre disposition, ou des nouvelles molécules mises sur le marché. La triade actuelle est simple : des molécules (trop peu efficaces ou perdant leur activité), des bactéries (à grande capacité d'adaptation, et capables d'acquérir et de disséminer des supports de multi-résistance), et des Hommes... plus vieux, plus fragiles, avec des pathologies nouvelles que l'on peut aujourd'hui prendre en charge... Le tout est pourtant en équilibre fragile, et de nouvelles molécules, aux mécanismes d'action innovants, seraient les bienvenues pour nous aider à peser un peu plus lourd dans la balance...

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1

ACTIVITE ANTIBACTERIENNE & CYTOTOXICITE

GRARE ET AL., 2006, PATHOLOGIE BIOLOGIE. 54 :470-476.

GRARE ET AL., 2007A, JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. 60:575-581.

I. OBJECTIFS

L'activité antibactérienne du Cx1 (para-guanidinoéthylcalix[4]arène) et son monomère, mCx1 (para-guanidinoéthylphénol), a été comparée à diverses molécules témoins, choisies en raison de leur communauté ou proximité de groupements fonctionnels : hexamidine et synthaline A, dans un 1^{er} temps. Aucun antibiotique actuellement commercialisé ou en cours de développement, à notre connaissance, ne possède de fonctions guanidinium ou apparentée ; nous nous sommes donc orientés vers d'autres molécules (antiseptique porteur de fonction amidine, antidiabétique pour la synthaline A mais porteuse de fonction guanidinium). Nous avons aussi souhaité évaluer l'activité antibactérienne d'une unité constitutive du Cx1, le monomère mCx1, afin de souligner l'intérêt d'une organisation fonctionnelle sous forme de calixarène (données préliminaires [Mourer et al., 2006]). Parallèlement à l'efficacité antibactérienne, la toxicité de ces composés sur cellules eucaryotes humaines a été évaluée afin d'affiner la balance bénéfice/risque.

L'évaluation s'est déroulée en 5 temps :

1. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI, par la méthode de microdilution en milieu liquide), sur 5 souches de référence (recommandées par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, CA-SFM, et par le CLSI) [NCCLS, 2003 ; CA-SFM, 2008], choisies comme représentatives des souches les plus fréquemment isolées lors d'Infections Associées aux Soins (IAS) [Grare et al., 2006].
2. Détermination des CMI sur 5 isolats cliniques, correspondant aux souches de référence testées, mais possédant un seul mécanisme de résistance, identifié, aux antibiotiques [Grare et al., 2007a].
3. Détermination des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) sur ces 10 souches (5 souches de référence, 5 isolats cliniques) afin d'évaluer le type d'action, bactéricide ou bactériostatique du Cx1 (méthode de dénombrement en milieu gélosé).
4. Evaluation de la toxicité des différentes molécules par détermination des Concentrations Inhibitrices 50% (CI₅₀) par le test au MTT, et des Concentrations Cytotoxiques 50% (CC₅₀) par le test au rouge neutre (RN). Ces tests ont été réalisés sur deux lignées de cellules eucaryotes, HaCaT (kératinocytes humains immortalisés) et MRC-5 (fibroblastes pulmonaires, embryonnaires humains).

5. Détermination des Index de Sélectivité (IS) par calcul du rapport entre la CI_{50} ou la CC_{50} et la CMI, mesurées à 24 h. Cela nous permet d'avoir une idée de la balance toxicité/efficacité pour les différentes molécules testées.

II. RÉSULTATS/DISCUSSION

GRARE ET AL., 2006, PATHOLOGIE BIOLOGIE. 54 :470-476.

GRARE ET AL., 2007A, JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. 60:575-581.

Ces travaux ont fait par ailleurs l'objet de communications affichées lors de congrès internationaux :

1. Grare M., Mourer M., Regnouf de Vains J.B., Finance C., Duval R.E. *Para-guanidinoethylcalix[4]arene* : a new product with promising *in vitro* activity against drug resistant bacteria. 8th Congress of Chemotherapy and Infection (ECC8), Budapest, 26-28 octobre 2006.

2. Grare M., Fontanay S., Mourer M., Regnouf de Vains J.B., Finance C., Duval R.E. *Para-guanidinoéthylcalix[4]arène* : un premier pas vers une nouvelle molécule antibactérienne ? 26^{ème} RICAI, Paris, 7-8 décembre 2006.

En conclusion, nous avons confirmé l'importance de la pré-organisation de charges positives de type guanidinium dans une structure rigidifiante, telle que le calixarène, pour améliorer l'activité antibactérienne : absence d'activité de la forme monomérique, mCx1, activité très intéressante, à la fois sur des bactéries à Gram – et à Gram + pour la forme calixarénique, Cx1. Cette activité est comparable à celle de l'hexamidine, antiseptique couramment utilisé en thérapeutique, avec comme avantage principal : une toxicité moindre, voire absente. Les index de sélectivité obtenus (16 à 131 selon les souches bactériennes considérées) sont très intéressants ; et nous ont poussé à évaluer le spectre antibactérien de notre composé leader. Une question restait cependant en suspens : le caractère bactériostatique ou bactéricide du Cx1 ; les CMB en milieu solide étant de réalisation difficile et souffrant d'une faible reproductibilité. Dans un 2^{ème} temps, nous avons donc effectué les courbes de bactéricidie de notre molécule vis-à-vis des 4 souches de référence.

Pourquoi avoir choisi deux lignées cellulaires, et pourquoi celles-là (fibroblastes MRC5 et kératinocytes HaCaT) ? Pourquoi avoir réalisé deux types de tests, viabilité (MTT) et cytotoxicité (RN) ? Comme exposé dans l'article [Grare et al., 2007a], nous n'avions pas à notre connaissance, d'antibiotique se rapprochant en terme de structure et de fonctions, au Cx1. Nous nous sommes par conséquent orientés sur l'hexamidine, de structure lointaine par comparaison au Cx1, mais porteur de

fonctions cationiques de type amidine, et vers la synthaline, porteuse de fonction guanidine. Pour le 1^{er} nous avons peu (ou pas) de données sur sa toxicité cutanée (aucune donnée sur lignées cellulaires *in vitro*), pour la seconde, nous savions que sa commercialisation avait été suspendue du fait de sa toxicité trop importante. Nous avons donc voulu comparer le pouvoir cytotoxique de ces molécules à celui du Cx1, sur deux lignées cellulaires pouvant servir de modèle pour une éventuelle application de notre composé en tant que topique. Par ailleurs, ce sont des lignées humaines, non cancéreuses, donc plus appropriées à l'évaluation d'antibactériens à visée humaine. D'autres auteurs ont réalisé des tests similaires, et recommandé ces lignées pour l'évaluation du pouvoir « irritant cutané » ou cytotoxique de certaines molécules [Cooper et al., 1990 ; Damour et al., 1992 ; Fabreguette, 1994 ; Boyce et al., 1995, Brosin et al., 1997]. Boyce et coll. ont par exemple évalué la toxicité de la chlorhexidine, de la polymyxine B ou de la mupirocine, à la fois sur des fibroblastes et des kératinocytes [Boyce et al., 1995]. D'autres auteurs ont montré une bonne corrélation entre le pouvoir irritant connu de certaines molécules et l'effet *in vitro* (test XTT) sur la viabilité de cellules HaCaT [Brosin et al., 1997]. Quant à l'utilisation de deux tests en parallèle, un test d'effet sur la viabilité (MTT) [Tatnall et al., 1990] et un test de cytotoxicité (Rouge Neutre) [Debbasch et al., 1999], certains auteurs ont souligné la nécessité de valider l'utilisation de tout test *in vitro*, selon la lignée cellulaire utilisée et la molécule testée [Weyerman et al., 2005]. En effet, certaines molécules sont capables de stimuler l'activité des deshydrogénases, et par conséquent de donner des résultats faussement positifs par le test MTT ; et les lignées cellulaires répondent de façon plus ou moins satisfaisante au test RN, qui nécessite une bonne adhésion des cellules au support de fait des nombreux lavages. En conclusion, nous avons confirmé dans notre travail, l'intérêt de l'utilisation de deux lignées (les HaCaT apparaissent plus sensibles au traitement), et des deux types de tests, qui apportent des données complémentaires.

In vitro activity of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria

Marion Grare, Maxime Mourer, Stéphane Fontanay, Jean-Bernard Regnouf-de-Vains,
Chantal Finance and Raphaël Emmanuel Duval*

Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament, UMR 7565, Nancy-Université—CNRS,
Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

Received 24 April 2007; returned 16 May 2007; revised 4 June 2007; accepted 11 June 2007

Objectives: Emergence of multidrug-resistant bacteria has encouraged vigorous efforts to develop antimicrobial agents with new mechanisms of action. In this study, the *in vitro* antibacterial activity of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene was evaluated and compared with that of its constitutive monomer, *para*-guanidinoethylphenol. Hexamidine, a widely used antiseptic, and synthalin A, an old antidiabetic and anti-trypanosomal compound, were chosen as references.

Methods: MIC and MBC were determined for five reference strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), as well as five antibiotic-resistant clinical isolates. Toxicity on MRC-5 and HaCaT eukaryotic cell lines was also evaluated by MTT and Neutral Red assays.

Results: No antibacterial activity was observed for *para*-guanidinoethylphenol (MIC $\geq$ 512 mg/L) and synthalin A (MIC $\geq$ 64 mg/L). Conversely, *para*-guanidinoethylcalix[4]arene and hexamidine: (i) showed a broad antibacterial spectrum, both on Gram-positive and on Gram-negative bacteria (MIC = 4 mg/L against *E. coli* and 8 mg/L against *S. aureus* for *para*-guanidinoethylcalix[4]arene), to a lesser degree against *E. faecalis* and *P. aeruginosa* (MIC = 32 mg/L); (ii) were bacteriostatic (MBC $\geq$ 256 mg/L); and (iii) MICs and MBCs obtained for clinical isolates were similar to those obtained with reference strains. Both compounds, the monomer and the calixarene, showed no apparent cytotoxicity, whereas hexamidine and synthalin A had significant toxic effects that increased with time and concentration and in a range of 100–1000 times that for calixarene.

Conclusions: In conclusion, results confirm *para*-guanidinoethylcalix[4]arene as a broad-spectrum new agent or an auxiliary in antimicrobial chemotherapy.

Keywords: calixarene, antibacterial agent, IC₅₀, CC₅₀, selectivity index

Introduction

During the last three decades, a dramatic increase in nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria has taken place. Recent studies reported that the prevalence of nosocomial infections caused by these microorganisms ranged from 4% to 10% in Europe.¹ Four bacterial species can be considered as the most frequent pathogens implicated in nosocomial infections: *Escherichia coli* (23%), *Staphylococcus aureus* (20%), *Pseudomonas aeruginosa* (11%) and *Enterococcus* spp. (6%).² The emergence of antibiotic-resistant bacteria has increased the

complexity of anti-infective therapies being administered in hospitals. Coagulase-negative staphylococci, *S. aureus* and *Enterococcus* spp. are very often responsible for nosocomial infections and often encountered in the hospital environment. For 2004, in the USA, the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report identified methicillin resistance in 59.5% of *S. aureus* infections in intensive care units (ICUs).³ This represented an increase of 11% in resistance when compared with rates for the period 1998–2002. From the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), data collected between 1999 and 2003 indicate that

*Corresponding author. Tel: +33-383-68-2336; Fax: +33-383-68-2357; E-mail: raphael.duval@pharma.uhp-nancy.fr

methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) accounted for 21% of infections due to *S. aureus* in Europe, but with large variation between countries, ranging from 1% in Northern Europe to 5% to 20% in Central Europe and 30% to 40% for Southern Europe and the UK.¹ For many years, vancomycin was the only effective treatment for serious MRSA infections. However, the latest NNIS report indicated that nearly 30% of all enterococci isolated from patients infected in ICUs are now resistant to vancomycin.³ In Europe, the proportion of glycopeptide-resistant enterococci is still limited; according to the EARSS, 0.9% of *Enterococcus faecalis* and 9% of *Enterococcus faecium* isolates were resistant to vancomycin.¹ In the USA, the first four cases of vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) were reported between 1997 and 1999,⁴ and, more recently, strains fully resistant to vancomycin [vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA)] were isolated from three patients.⁵ In the past few years, only four new agents with activity against MRSA and/or activity against vancomycin-resistant enterococci (VRE) have been introduced (quinupristin/dalfopristin, linezolid, daptomycin and tigecycline). However, the emergence of linezolid resistance in vancomycin-resistant *E. faecium* has been recently reported in Italy.⁶

Gram-negative bacteria of the Enterobacteriaceae family are also important causes of nosocomial infections, especially urinary tract infections. According to the latest NNIS report, in 2003, 20.6% of all *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients in ICUs, in the USA, were non-susceptible to third-generation cephalosporins.³ This represented a 47% increase when compared with resistance rates during 1998–2002. Moreover, plasmid-mediated quinolone resistance has been reported in *K. pneumoniae* and *E. coli*, associated with acquisition of the *qnr* gene.⁷

P. aeruginosa and *Acinetobacter* spp. are also a common cause of morbidity and mortality in hospitalized patients worldwide. According to the 2004 NNIS System report, the rate of resistance to third-generation/antipseudomonal cephalosporins, imipenem and quinolones increased by 20%, 15% and 9%, respectively, for *P. aeruginosa* strains isolated in 2003 when compared with isolates from 1998 to 2002.³ Similar changes have been noted in European countries.¹

Thus, a growing number of bacteria are resistant to all or almost all of our currently available drugs. Given this situation, there is an urgent need to develop new antibacterial agents that target the broadest spectrum of bacteria. A new therapeutic agent with a new mechanism of action would be particularly attractive, because it could show less potential for cross-resistance to currently prescribed agents. Among the various approaches that are under evaluation in our group is one dedicated to polycationic calixarene-based guanidinium podands that display an intrinsic antimicrobial activity. Calixarenes are oligomeric phenolic macrocycles, and it has been demonstrated that their excellent organizing behaviour into rigid structures gives them many functionalities. Very few reports, essentially only in the form of patents, have studied their antimicrobial properties; however, some calixarenes have shown interesting activities against bacteria, fungi, viruses and cancerous cells.^{8–12} Most experimental work has been carried out with Macrocydon, since 1950. This compound enters macrophages by endocytosis and significantly affects the growth of *Mycobacterium tuberculosis* by disturbing lipid metabolism, with an inhibition of triglyceride lipase and phospholipases.^{13–15} In another approach, Ungaro *et al.* studied macrobicyclic peptido calixarenes that linked with

the D-alanyl-D-alanine residue of the peptidoglycan and might act as vancomycin mimics. The compounds tested showed an anti-Gram-positive activity from moderate to good, although slightly inferior to vancomycin, and no activity was found against Gram-negative bacteria.^{16,17}

On the basis of the fact that most bacteria are negatively charged, and focusing on the aforementioned organizing behaviour, the introduction of positive charges on the calixarene core leads to a constrained oligomeric polycation. As antimicrobial agents, the guanidinium derivatives have been modestly investigated in recent years. Most of the studied compounds are poly-guanidinium species derived from the old, but non-commercial, anti-diabetic and anti-trypanosomal synthalin A.^{18,19} In our laboratory, we have observed a remarkable gain of antibacterial properties in the spatial organization of the monomeric *para*-guanidinoethylphenol into its tetrameric cyclic isomer.²⁰ The aim of this study was to confirm and expand the above findings by testing the activities of the *para*-guanidinoethylcalix[4]arene (compound **4**, Figure 1) and its monomeric equivalent (compound **3**, Figure 1), against five ATCC reference strains and five antibiotic-resistant Gram-positive and Gram-negative strains, containing different resistance determinants. Hexamidine (compound **1**, Figure 1), a commonly used antiseptic solution, and synthalin A (compound **2**, Figure 1) were chosen as references in this study, for their resemblance in terms of functional groups (guanidinium or amidine functions). Drugs were also tested for effect on viability by MTT assay, with determination of IC₅₀, and for cytotoxicity by Neutral Red assay, with evaluation of CC₅₀, in HaCaT and MRC-5 cell lines, in order to determine the selectivity index (SI).

Materials and methods

Bacterial strains

E. coli ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 and ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were used as reference strains, following guidelines of the CLSI (formerly NCCLS)²¹ and of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).²² Five clinical isolates obtained from blood or rectal specimens were also tested in this study: penicillinase-producing *E. coli* (EcR1), methicillin-resistant *S. aureus* (*mecA* gene) (SaR1), vancomycin-resistant *E. faecium* (*vanB* gene) (EfR1), vancomycin- and teicoplanin-resistant *E. faecalis* (*vanA* gene) (EfR2) and *P. aeruginosa* overexpressing efflux pumps (PaR1). Isolates were selected on the basis of their resistant antimicrobial susceptibility testing profile [Table S1, available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org>)]. Antimicrobial resistances were determined by the automated instrument VITEK2 (BioMérieux, France). Strains were grown on Mueller–Hinton agar (Difco, 225250) or in Mueller–Hinton broth (Difco, 275730).

Antimicrobial agents

Four drugs were tested: hexamidine ($M = 668.22$ g/mol) (compound **1**), synthalin A ($M = 498.45$ g/mol) (compound **2**), *para*-guanidinoethylphenol ($M = 293.24$ g/mol) (compound **3**) and *para*-guanidinoethylcalix[4]arene ($M = 1221.1$ g/mol) (compound **4**) (Figure 1). Compounds **3** and **4** were prepared as trifluoroacetate salts, as described previously.²⁰ Compound **2** was prepared as **3** and **4**, starting from 1,6-diamino hexane. Compound **1** was obtained by evaporation and freeze-drying commercial alcoholic

Antibacterial activity of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene

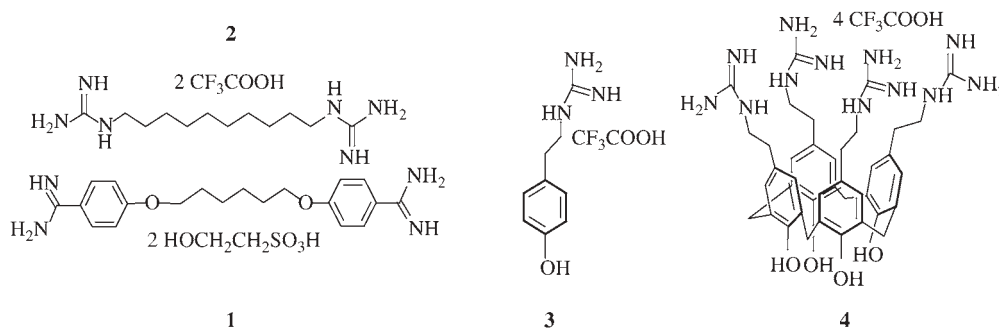


Figure 1. Chemical structures of: **1**, hexamidine; **2**, synthalin A; **3**, *para*-guanidinoethylphenol; and **4**, *para*-guanidinoethylcalix[4]arene.

solution at 1% (w/v). The four compounds were fully characterized, and each batch was controlled by means of [^1H]- and [^{13}C]-NMR elemental analyses. Solutions were freshly prepared and kept for 1 week at 4°C . The solutions were filtered through a $0.22\ \mu\text{m}$ pore-size filter (Millex[®]GP, $0.22\ \mu\text{m}$, Millipore, France) before each experiment.

MIC determination

MICs were determined by broth microdilution method recommended by the CLSI.²¹ For MIC determination, suspensions were prepared by suspending one isolate colony from Mueller–Hinton plates in 5 mL of Mueller–Hinton broth. After 24 h of growth, suspensions were diluted in distilled water to obtain a final inoculum of 5×10^5 – 5×10^6 cfu/mL. Purity of isolates was checked throughout the study by examining the colony morphology and Gram staining. Two-fold serial dilutions of drugs were prepared in Mueller–Hinton broth in 96-well plates (Greiner, 650161), starting from a stock solution of 10^{-2} M. An equal volume of bacterial inoculum was added to each well on the microtitre plate containing 0.05 mL of the serial compound dilutions. After incubation for 18–24 h at 35°C , MIC was determined with an ELISA reader (read at 540 nm; Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, France) as the lowest concentration of compound whose absorbance was comparable with the negative control wells (broth only or broth with drug, without inoculum). Results are expressed as mean values of four independent determinations. Reference agents in clinical use were also tested in order to check susceptibility of strains: amoxicillin, ampicillin, oxacillin, penicillin G, ticarcillin and vancomycin.

MBC determination

The MBC was determined after the MIC assay. The MBC was obtained by subculturing the contents of each negative well and from the positive control (broth with inoculum, without drug) of MIC determination, onto substance-free Mueller–Hinton agar Petri dishes. The plates were incubated at 35°C for 24 h. The MBC was taken as the lowest concentration of substance that results in more than 99.9% reduction of the initial inoculum.²³ Results are expressed as mean values of four independent determinations. If MBC is one or two dilutions above MIC, the drug is considered bactericidal.²⁴

Cell lines and cell culture

HaCaT (human keratinocytes)²⁵ were kindly provided by Pierre Fabre Institut (Toulouse, France) and MRC-5 (human pulmonary

embryonic fibroblasts) were obtained from BioMerieux (France). These cell lines were chosen as a model for the evaluation of antiseptics and/or antibiotics that could be used during acute skin infections, as previously proposed by some authors.^{26,27} The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen 61965) for HaCaT and in modified Eagle's medium (MEM; Invitrogen 41090) for MRC-5 supplemented with 10% decomplexed fetal bovine serum (Invitrogen 10270, lot 40Q5150K) without antibiotics at 37°C , 5% CO_2 , under a humid atmosphere. HaCaT or MRC-5 were plated at 10^4 cells/well in 96-well plates (Sarstedt 831835). Forty-eight hours after plating, the growth medium was removed and replaced with the test solutions (100 μL). After 24, 48 and 168 h of exposure, viability and cytotoxicity tests were performed.

MTT assay

Viability tests were performed using a commercially available cell proliferation reagent MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma 1350380), as described previously.^{28,29} The assay is based on cleavage of the tetrazolium salt MTT by active mitochondria to produce an insoluble purple formazan salt. As this conversion only occurs with viable cells, it directly correlates with cell count. After 24, 48 and 168 h of exposure, 10 μL of a 5 mg/mL MTT solution was added to each well and plates were incubated at 37°C for 4 h. Then, insoluble purple formazan was dissolved by adding 100 μL of SDS to each well. The absorbance A_{540} was measured with a reference wavelength of A_{690} , using an ELISA reader (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation). The results were expressed as the per cent absorbance of treated versus untreated control cultures. Eight wells per dose and time point were counted in three different experiments.

Neutral Red assay

The cytotoxicity assay is based on the incorporation of the supravital dye, Neutral Red, into the lysosomes of viable cells after incubation with drugs. The amount of dye, after extraction from the lysosomes, is quantified spectrophotometrically and compared with Neutral Red recovered from untreated control cultures. The test was performed as described previously.³⁰ After 24, 48 and 168 h of exposure, the drug-containing medium from each well was replaced with 200 μL of MEM without phenol red (Invitrogen 51200) containing 50 mg/L Neutral Red for an additional 3 h incubation. Then, cultures were rinsed three times with PBS. Following removal of PBS, 200 μL of a solution of 1% acetic acid/50% ethanol was added to each well to extract the dye from lysosomes of viable cells. Absorbance was read at 540 nm using an ELISA reader (Multiskan EX, Thermo Electron

Corporation). Eight wells per dose and time point were counted in three different experiments.

Results

MIC and MBC values are listed in Table 1. Hexamidine **1** showed anti-Gram-positive as well as anti-Gram-negative activities, with weaker activity against *P. aeruginosa*. Synthalin A **2** was relatively poor against all strains tested. The monomer **3** was devoid of activity (MIC $\geq$ 512 mg/L for all strains), whereas *para*-guanidinoethylcalix[4]arene exhibited an antibacterial spectrum quite similar to hexamidine. MICs obtained for calixarene were 4 mg/L against *E. coli*, 8 mg/L against the two strains of *S. aureus* and 32 mg/L against *P. aeruginosa* and *E. faecalis*.

For clinical isolates (Table 1), MICs obtained for hexamidine **1** and *para*-guanidinoethylcalix[4]arene **4** were similar to those obtained for reference strains (Table 1), although one or two dilutions higher for some. However, differences observed were not considered significant. Thus, these two compounds showed a similar broad antibacterial spectrum, with activity extending to antibiotic-resistant bacteria. Synthalin A **2** and the monomer **3** remained inactive against these clinical isolates.

MBC has not been determined for monomer **3**, because of high MIC values. MBCs obtained for hexamidine **1** and calixarene **4** were at least eight times higher than MICs ($\geq$ 64 mg/L for both compounds; Table 1). This suggests that they are bacteriostatic, for all strains tested.

Viability and cytotoxicity results are summarized in Table 2. When the viability and the cytotoxicity assays are compared, the IC₅₀ and CC₅₀ values obtained are in accordance. The results from the two assays indicate that there are no differences between the two cell lines regarding their sensitivity to four compounds. The monomer **3** and the calixarene **4** showed no

apparent cytotoxicity whatever the time of incubation (IC₅₀ > 256 mg/L after 24 h of exposure of HaCaT cells to both monomer **3** and calixarene **4**). In contrast, loss of cell viability was seen after 24 h of exposure to hexamidine **1** (IC₅₀ = 36.1 mg/L for HaCaT), and slightly lower concentrations were required for this effect after 48 and 168 h of incubation (IC₅₀, respectively, 17.2 and 5 mg/L after 48 and 168 h for HaCaT). Synthalin A **2** also showed significant cytotoxicity, especially after 168 h of exposure (IC₅₀, respectively, 97 and 1.2 mg/L after 24 and 168 h for HaCaT).

On the basis of the MIC and IC₅₀ values determined after 24 h of exposure, the SI (SI = IC₅₀/MIC) was calculated (Table 3). SI values obtained with two assays (MTT and Neutral Red) were in good agreement. Very good SI values were obtained with the *para*-guanidino ethylcalix[4]arene **4** (SI = 131 for *E. coli*, 66 for both *S. aureus* strains and 16 for *P. aeruginosa*), much higher than those obtained with monomer **3** (SI $\leq$ 2 for all strains), hexamidine **1** (SI values between 0.6 and 37) or synthalin A **2** (SI values between 0.1 and 15), our reference compounds.

Discussion

Antibiotic- and antiseptic-resistant bacteria are the major cause of nosocomial infections, with severe morbidity and mortality worldwide. This rising health and socioeconomic problem demands new measures for prevention and control. A number of new antibiotics have recently been approved by the FDA, such as tigecycline, the first compound of a new class of agents, the glycylcyclines, and daptomycin, a cyclic lipopeptide effective against MRSA.^{23,31}

The results presented here concern a new kind of polycationic synthetic compound displaying an intrinsic antibacterial activity. To the best of our knowledge, no reference antibiotic in

Table 1. MICs and MBCs (mg/L) obtained by broth microdilution method, according to CLSI and CA-SFM guidelines

	1		2		3		4		5	
	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)
Reference strains										
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8	256	64	256	512	ND	4	256	4 ^a	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	4	128	64	>512	512	ND	8	256	<1 ^b	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<1	128	16	>512	512	ND	8	256	<1 ^b	ND
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2	128	256	>512	>512	ND	32	>256	<1 ^c	ND
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	32	>512	128	>512	>512	ND	32	256	16 ^d	ND
Clinical isolates										
penicillinase-producing <i>E. coli</i>	8	64	64	>512	512	ND	2	256	>256 ^a	ND
MRSA (<i>mecA</i> gene)	2	64	64	64	512	ND	8	256	256 ^b	ND
<i>E. faecium</i> (<i>vanB</i> gene)	2	64	256	>512	>512	ND	8	128	64 ^c	ND
<i>E. faecalis</i> (<i>vanA</i> gene)	4	256	>256	>512	>512	ND	64	256	256 ^c	ND
<i>P. aeruginosa</i> (overexpression of efflux pumps)	64	>512	256	>512	>512	ND	64	>256	64 ^d	ND

ND, not determined; **1**, hexamidine; **2**, synthalin A; **3**, *para*-guanidinoethylphenol; **4**, *para*-guanidinoethylcalix[4]arene; **5**, reference antibiotics.

^aAmoxicillin.

^bOxacillin.

^cVancomycin.

^dTicarcillin.

Table 2. Determination of IC₅₀ and CC₅₀ values from the data obtained with the viability assay (MTT) and the cytotoxicity assay (Neutral Red), respectively

Time	1				2				3				4			
	IC ₅₀ (mg/L)		CC ₅₀ (mg/L)		IC ₅₀ (mg/L)		CC ₅₀ (mg/L)		IC ₅₀ (mg/L)		CC ₅₀ (mg/L)		IC ₅₀ (mg/L)		CC ₅₀ (mg/L)	
	HaCaT	MRC5	HaCaT	MRC5	HaCaT	MRC5	HaCaT	MRC5	HaCaT	MRC5	HaCaT	MRC5	HaCaT	MRC5	HaCaT	MRC5
24 h	36.1	37.1	9.1	10.5	97	140.6	34	181	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
48 h	17.2	29.1	7.8	8.1	67	12.7	3.3	60	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
168 h	5	4.9	1.3	<1	1.2	<1	<1	<1	38.1	54.1	36	72	>256	141	>256	>256

HaCaT and MRC-5 cell lines were grown as adherent-culture in a 96-well microplate. Compounds were added at concentrations from 256 to 1 mg/L for 24, 48 and 168 h. IC₅₀ and CC₅₀ values are representative of three independent determinations. **1**, hexamidine; **2**, synthalin A; **3**, *para*-guanidinoethylphenol; **4**, *para*-guanidinoethylcalix[4]arene.

clinical use, or under current investigation, carries a guanidinium function. Hexamidine, widely used in skin disinfection, and synthalin A, a non-commercial aliphatic bis guanidinium, were chosen here for their similarity in terms of functional groups, in order to obtain some preliminary structure–activity relationships. However, little data exist concerning the mechanism of action of hexamidine and contradictory information about its antibacterial spectrum is found in the literature.³² It has also been suggested that the bactericidal activity of some commercial alcoholic solutions is attributable to synergy between ethanol and hexamidine.³² In our study, we confirm, for hexamidine **1**, a bacteriostatic activity extending to both Gram-positive and Gram-negative strains. Synthalin A **2** is devoid of antibacterial activity, so the guanidinium group alone seems not to be sufficient for antibacterial activity. Hexamidine **1** and the *para*-guanidinoethylcalix[4]arene **4** showed an interesting antibacterial activity: aromatic heterocycles, alkyl side chains and guanidinium groups, in the correct spatial orientation, could have a real importance in terms of antibacterial activity. We confirmed here the previously observed lack of antibacterial activity of monomeric *para*-guanidinoethylphenol **3** and the significant gain of activity with the spatial organization into its tetrameric cyclic isomer.²⁰ The presence of aromatic heterocycles and guanidinium groups is not sufficient to obtain an antibacterial activity; organization into a calixarene structure that closely tethers and arrays at its upper rim four guanidinium groups seem to be very important; it could result in a synergistic effect in ionic interactions with membrane targets. We are currently investigating membrane targets that may synergize the ionic effects reported here.

The *para*-guanidinoethylcalix[4]arene **4** appears as a very interesting compound: taken together, our results show that this drug is effective in inhibiting several Gram-positive and Gram-negative bacteria, without increasing toxicity on HaCaT and MRC-5 cell lines. Its broad antibacterial spectrum is similar to hexamidine **1**. Interestingly, hexamidine **1** and synthalin A **2** show a higher time-dependent cytotoxicity.

MTT and Neutral Red assays used in this study are commonly employed for the detection of cytotoxicity or cell viability following exposure to various compounds. Only few antibiotics and antiseptics have been tested on human fibroblasts and keratinocytes.^{26,27} Considering a possible topical use, it appeared essential for us to test our compounds on these two cell lines. Synthalin A was considered as a cytotoxicity control because of its known toxicity on cells.¹⁸ It has been previously reported that different cytotoxicity assays can give different results depending on the test agent used and the assay employed.^{33,34} In our study, the MTT assay appears to be equally sensitive as the Neutral Red assay in detecting early toxicity (after 24 h of exposure). However, two limitations should be noted: (i) MTT assay measures the activity of mitochondrial dehydrogenases that could be enhanced by some compounds; (ii) the Neutral Red assay seems to be more consistent with the cell line; results are more reproducible, absorbances are higher and standard deviations less significant when the test is performed on the HaCaT cell line. We therefore decided that the two assays should be used to determine cell viability (MTT assay) and cytotoxicity (Neutral Red assay) in *in vitro* studies, as this would increase the reliability of the results obtained.

As we demonstrated a significant antibacterial activity with the *para*-guanidinoethylcalix[4]arene **4**, against our five

Table 3. SI obtained for five reference strains, after 24 h of exposure to four compounds, on HaCaT cell line

Reference strain	1		2		3		4	
	MTT	NR	MTT	NR	MTT	NR	MTT	NR
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5	2	4	0.3	2	2	131	98
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	9	5	4	0.3	2	2	66	50
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	≥37	≥18	15	1	2	2	66	50
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	19	9	1	<0.1	<2	<2	16	12
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	0.6	2	0.1	<2	<2	16	12

NR, Neutral Red. **1**, hexamidine; **2**, synthalin A; **3**, *para*-guanidinoethylphenol; **4**, *para*-guanidinoethylcalix[4]arene.

reference strains, we attempted to determine whether its efficiency is conserved against antibiotic-resistant bacteria. Five clinical isolates were included in this study. These isolates were chosen because of the presence of only one phenotypically or genetically characterized resistance determinant. Resistance profiles are typical of resistant bacteria frequently isolated from nosocomial infections.² We showed that the calixarene derivative **4** retains its efficiency against antibiotic-resistant bacteria, such as MRSA or VRE. This means that the *para*-guanidinoethylcalix[4]arene **4** is not affected by the resistance mechanisms of these clinical isolates (such as β -lactamase, PBP2a or efflux pumps) and may represent an alternative agent or auxiliary to control important nosocomial pathogens. Time–kill curve studies are currently under investigation to confirm and expand our understanding of the time-dependent or concentration-dependent nature of the various compounds.

These results make the *para*-guanidinoethylcalix[4]arene **4** potentially very valuable as a new agent or adjuvant for antimicrobial chemotherapy. A key to future developments is to clearly understand the mode of action of this antibacterial compound. Actually, several polycationic peptides isolated from animals, plants and bacterial species have been studied in terms of antimicrobial properties.³⁵ Some of these small, positively charged peptides possess a broad antibacterial spectrum, including antibiotic-resistant bacteria such as MRSA. Structure–activity relationship studies of these peptides reveal two main requirements for antimicrobial activity: (i) a cationic charge; and (ii) an induced amphipathic conformation.³⁶ Their mechanism of action has been most studied on Gram-negative bacteria; the initial association of peptides with the bacterial membrane occurs through electrostatic interactions between the cationic peptide and anionic lipopolysaccharide in the outer membrane leading to membrane perturbation.³⁶ Access to the cytoplasmic membrane is then possible through these destabilized areas. Different mechanisms lead to perturbation of the integrity of the cytoplasmic membrane or peptide translocation into the cytoplasm. Cationic peptides are thought to interact with DNA, RNA and/or cellular proteins and to inhibit synthesis of various compounds.

The *para*-guanidinoethylcalix[4]arene is a polycationic compound, and we could speculate that its mechanism of action should be close to that of polycationic peptides. Additional studies are required to determine its actual mode of action and to elucidate the relationship between calixarene structure and antibacterial activity. This requires the development of parent

compounds and their non-conic conformers, as well as the linear oligomers. This is under current investigation.

Acknowledgements

We are grateful to the MRES, CNRS and Institut Jean Barriol for financial support, especially M. Mourer for a PhD grant. We thank Pr. A. Lozniewski for reference strains and clinical isolates (Bacteriology Laboratory, CHU Nancy, France) and Dr G. Prevost for his critical reading of the manuscript (Institute of Bacteriology, Faculty of Medicine, Louis Pasteur University, Strasbourg, France).

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org>).

References

- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). *Annual Report 2005. Data summary from January 1999 through December 2005, issued October 2006*. http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202005_tcm61-34899.pdf.
- Lepoutre A, Branger B, Garreau N *et al.* *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales en France (2001) reported through the Réseau National de Surveillance et d'Investigation des Infections Nosocomiales (RAISIN), Institut de Veille Sanitaire (InVS): 2004*. http://212.234.146.165/publications/2003/raisin_enp_2001/raisin_enp_2001_p_19_50.pdf.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS). System Report. Data summary from January 1992 through June 2004. *Am J Infect Control* 2004; **32**: 470–85.
- Smith T, Pearson ML, Wilcox KR *et al.* Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999; **340**: 493–501.

Antibacterial activity of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene

5. Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12**: 16–23.
6. Bonora MG, Solbiati M, Stepan E *et al*. Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multi-locus sequence typing C1 epidemic lineage. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1153–5.
7. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; **351**: 797–9.
8. Coveney D, Costello B. Calixarene-derivatives having anti-viral activity. European Patent, December 2003 EP 1367044A1.
9. Coveney D, Costello B. Antiviral-compounds. US Patent, May 2005 05/011345A1.
10. Harris SJ. Calixarene-based compounds having antibacterial, antifungal, anticancer-HIV activity. WO Patent, July 1995 95/19974.
11. Harris SJ. Anti-viral compounds. WO Patent, June 2002 02/44121.
12. Hwang KM, Qi YM, Liu SY *et al*. Inhibition and treatment of infection by enveloped virus with calix(n)arene compounds. WO Patent, February 1994 94/03164.
13. Cornforth JW, Hart PD, Nicholls GA *et al*. Antituberculous effects of certain surface-active polyoxyethylene ethers. *Br J Pharmacol Chemother* 1955; **10**: 73–88.
14. Colston MJ, Hailes HC, Stavropoulos E *et al*. Antimycobacterial calixarenes enhance innate defense mechanisms in murine macrophages and induce control of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect Immun* 2004; **72**: 6318–23.
15. Hart PD, Armstrong JA, Brodaty E. Calixarenes with host-mediated potency in experimental tuberculosis: further evidence that macrophage lipids are involved in their mechanism of action. *Infect Immun* 1996; **64**: 1491–3.
16. Casnati A, Di Modugno E, Fabbi M *et al*. Synthesis, antimicrobial activity and binding properties of calix[4]arene based vancomycin mimics. *Bioorg Med Chem Lett* 1996; **6**: 2699–704.
17. Williams DH, Bardsley B. The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999; **38**: 1172–93.
18. Ostenson CG. Effect of the biguanide synthalin A on the pancreatic A2-cell of the guinea pig. *Exp Clin Endocrinol* 1983; **81**: 255–62.
19. Ollivier G, Legros D. Human African trypanosomiasis: a history of its therapies and their failures. *Trop Med Int Health* 2001; **6**: 855–63.
20. Mourer M, Duval RE, Finance C *et al*. Functional organisation and gain of activity: the case of the antibacterial *para*-guanidinoethylcalix[4]arene. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; **16**: 2960–3.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard M7-A6*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.
22. CA-SFM. *Communiqué 2007 (Edition janvier 2007)*. <http://www.sfm.asso.fr/nouv/general.php?pa=2>.
23. Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 611–4.
24. Fauchere JL, Avril JL. Antibiotiques. In: *Bactériologie Générale et Médicale*. Paris, France: Ellipses, 2002; 149–76.
25. Fusenig NE, Boukamp P. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* 1998; **23**: 144–58.
26. Damour O, Zhi Hua S, Lasne F *et al*. Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns* 1992; **18**: 479–85.
27. Wilson JR, Mills JG, Prather ID *et al*. A toxicity index of skin and wound cleansers used on *in vitro* fibroblasts and keratinocytes. *Adv Skin Wound Care* 2005; **18**: 373–8.
28. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55–63.
29. Harmand PO, Duval R, Delage C *et al*. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. *Int J Cancer* 2005; **114**: 1–11.
30. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 1985; **24**: 119–24.
31. Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J *et al*. *In vitro* activity of daptomycin against Gram-positive European clinical isolates with defined resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1007–11.
32. Fleurette J. Diamidines aromatiques. In: Fleurette J, Freney J, Reverdy ME, eds. *Antiseptie et Désinfection*. Paris, France: ESKA Editions, 1995; 320–4.
33. Fotakis G, Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006; **160**: 171–7.
34. Weyerman J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 2005; **288**: 369–76.
35. Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F *et al*. Antimicrobial activity of polycationic peptides. *Peptides* 1999; **20**: 1265–73.
36. Powers JP, Hancock RE. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 2003; **24**: 1681–91.

Chapitre 2

SPECTRE D'ACTIVITE

GRARE ET AL., 2009A, CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION. IN PRESS.

I. OBJECTIFS

Compte tenu de l'absence d'activité du mCx1, et de la synthaline A, nous avons décidé de ne pas poursuivre plus avant leur évaluation. Nous avons, en conséquence, choisi un nouveau comparateur, la chlorhexidine (CHX), antiseptique cationique, à large spectre (Gram + et Gram -), plus comparable en terme d'activité au Cx1 [Grare & Duval, données non publiées].

Le Cx1, comme montré précédemment, possède une activité intéressante, à la fois sur les bactéries à Gram + et à Gram -, et se distingue de l'hexamidine par l'absence de toxicité sur cellules eucaryotes. Cela définit des index de sélectivité très intéressants, supérieurs à ceux obtenus pour l'hexamidine, et même la chlorhexidine [Grare & Duval, données non publiées]. Nous avons voulu améliorer nos connaissances sur le spectre d'activité du Cx1 ; en conséquence, nous avons déterminé les CMI sur 77 isolats cliniques, et 13 souches de référence, afin d'évaluer le spectre d'activité du Cx1 et de le comparer à celui de l'hexamidine et de la chlorhexidine. Les isolats cliniques ont été choisis en fonction de leur profil de résistance aux antibiotiques classiquement utilisés en routine, et de manière à avoir une vue d'ensemble sur l'activité du Cx1 sur les isolats le plus souvent rencontrés en clinique (choix en fonction du genre, de l'espèce, et du ou des mécanisme(s) de résistance identifiés) [Grare et al., 2009a].

Les isolats cliniques suivants ont été étudiés :

- Entérobactéries : 20 souches (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. koseri*, *P. vulgaris*, *E. cloacae*, *M. morgani*, *P. stuartii*, *S. marcescens*, *Y. enterocolitica*), porteuses de pénicillinases, céphalosporinases, BLSE ou céphalosporinase hyperproduite, avec des profils de résistance variables aux fluoroquinolones et aux aminosides ;
- Bacilles à Gram – non fermentants : 10 souches (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*), possédant différents profils de résistance, certaines souches pouvant être classées comme multi-résistantes ;
- *Staphylococcus aureus* : 15 souches (3 SASM, 10 SARM, 2 VISA), possédant divers profils de résistance aux aminosides et MLSK ;
- Staphylocoques à coagulase négative (SCN) : 12 souches (2 SCN-MS, 10 SCN-MR), possédant divers profils de résistance aux aminosides et MLSK ;

- *Enterococcus* spp. : 14 souches (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. avium*), possédants différents profils de résistance aux glycopeptides (vanA, vanB, vanC1/C2) ;
- Autres bactéries à Gram + : 5 souches (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *L. monocytogenes*, *C. jeikeium*, *B. cereus*) ;
- Mycobactéries : 1 souche (*M. chelonae*).

Sur l'ensemble de ces souches ont été évaluées les CMI du Cx1, de l'hexamidine et de la chlorhexidine.

II. RÉSULTATS/DISCUSSION

GRARE ET AL., 2009A, CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION. IN PRESS.

Ces travaux ont fait par ailleurs l'objet de communications affichées lors de congrès internationaux :

3. Grare M., Mourer M., Fontanay S., Regnouf de Vains J.B., Finance C., Duval R.E.

Activity of para-guanidinoethylcalix[4]arene against clinical isolates of MRSA, VRE and extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*. 47th ICAAC, September 17-20th 2007, Chicago, USA.

4. Grare M., Mourer M., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.-B., Finance C., Duval R.E.

Le para-guanidinoéthylcalix[4]arène : Activité sur SARM, ERG et sur Entérobactéries productrices de BLSE... Cytotoxicité... Cible d'action ? 27^{ème} RICAI, 6-7 décembre 2007, Paris, France.

N.B. : Certaines données, obtenues lors d'une étude préliminaire sur le Cx1 et l'hexamidine, n'ont pas été publiées. Les résultats obtenus étaient les suivants :

- (i) une activité modérée sur *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* et *Listeria monocytogenes* (32, 64, 64 mg/L pour le Cx1, et <1, 2 et 16 mg/L pour l'hexamidine, respectivement pour chacune de ces 3 souches).
- (ii) une activité intéressante sur *Corynebacterium jeikeium* et *Bacillus cereus* (<1 et 16 mg/L pour le Cx1, et <1 pour l'hexamidine, respectivement pour les deux souches).
- (iii) une activité intéressante est obtenue sur *Mycobacterium chelonae* (CMI <1 mg/L sur la souche de référence, 8 mg/L sur un isolat clinique pour le Cx1). Cette étude n'a pu être

menée, pour des raisons matérielles, que sur le Cx1. Les expériences ont été réalisées dans le LSM3 du laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy, en collaboration avec le Dr. Michèle DAILLOUX, et le Dr. Catherine LAURAIN.

En conclusion, dans cette 2^{ème} partie de l'étude, nous avons confirmé le large spectre de notre molécule, avec une activité conservée sur isolats cliniques résistants voire multi-résistants aux antibiotiques : SARM, ERG, Entérobactéries productrices de BLSE... De façon très intéressante, une activité très variable a été obtenue d'une Entérobactérie à une autre, ainsi qu'entre les différentes souches de Staphylocoques et d'Entérocoques. Cela peut nous donner un 1^{ère} indice quant à une éventuelle interaction Cx1/paroi bactérienne, qui sera plus amplement discuté dans la partie « Discussion Générale ».

Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine

M. Grare, H. M. Dibama, S. Lafosse, A. Ribon, M. Mourer, J.-B. Regnoul De Vains, C. Finance and R. E. Duval

SRSMC, Nancy-University, CNRS, Nancy, France

Abstract

Use of antiseptics and disinfectants is essential in infection control practices in hospital and other healthcare settings. In this study, the *in vitro* activity of a new promising compound para-guanidinoethylcalix[4]arene (CxI) has been evaluated in comparison with hexamidine (HX) and chlorhexidine (CHX), two older cationic antiseptics. The MICs for 69 clinical isolates comprising methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, methicillin-sensitive *S. aureus*, coagulase-negative staphylococci (CoNS) (with or without *mecA*), vancomycin-resistant enterococci, *Enterobacteriaceae* producing various β -lactamases and non-fermenting bacilli (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*) were determined. CxI showed similar activity against *S. aureus*, CoNS and *Enterococcus* spp., irrespective of the presence of *mecA* or *van* genes, or associated resistance genes, with very good activity against CoNS (MIC <1 mg/L). Variable activities were observed against *Enterobacteriaceae*; the MICs determined seemed to be dependent both on the genus (MICs of 2, 8 and 64 mg/L for *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* and *Yersinia enterocolitica*, respectively) and on the resistance phenotype (production of ESBLs or other β -lactamases; overproduction of AmpC). Poor activity was found against non-fermenting bacilli, irrespective of the resistance phenotype. CHX appeared to be the most active compound against all strains, with broad-spectrum and conserved activity against multidrug-resistant strains. HX showed a lower activity, essentially against Gram-positive strains. Consequently, the differences observed with respect to CxI suggest that they are certainly not the consequence of antibiotic resistance phenotypes, but rather the result of membrane composition modifications (e.g. of lipopolysaccharide), or of the presence of (activated) efflux-pumps. These results raise the possibility that CxI may be a potent new antibacterial agent of somewhat lower activity but significantly lower toxicity than CHX.

Keywords: Antiseptics, calixarene, cationic compounds, chlorhexidine, hexamidine, multidrug-resistant bacteria, nosocomial pathogens

Original Submission: 15 July 2008; **Revised Submission:** 21 November 2008; **Accepted:** 26 November 2008

Editor: M Drancourt

Clin Microbiol Infect

Corresponding author and reprint requests: Dr R. E. Duval, Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament, SRSMC, Nancy-University, CNRS, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France
E-mail: raphael.duval@pharma.uhp-nancy.fr

Introduction

Quaternary ammonium compounds (QAC) such as benzalkonium chloride, bisbiguanides such as chlorhexidine (CHX), polymeric biguanides such as polyhexamethylene biguanide (PHMB) and diamidines such as hexamidine (HX) have been widely used for over half a century [1]. Due to their intrinsic positive charge, these cationic compounds bind with high affinity to the negatively charged cell walls and membranes of

bacteria, and disruption is brought about by perturbations of the binding sites [2]. Biocides are clearly different from antibiotics with respect to their (i) mode of action, (ii) condition of use, and (iii) acquired and intrinsic mechanisms by which bacteria resist their effects. However, intensive exposure of hospital pathogens to biocides, similar to that of antibiotics, may result in the emergence of—often associated—resistance to these agents [3]. For example, *qac* genes (which confer resistance to quaternary ammonium compounds) are often found in *Staphylococcus aureus* strains carrying *mecA* genes or the β -lactamase gene *blaZ*, on transposon Tn552 [4,5]. The progressive reduction of the therapeutic effectiveness of the available antibiotics and antiseptics as a result of the spread of antimicrobial resistance underlines (i) the necessity to evaluate the efficiency of available antiseptics, and (ii) the urgency of the development of new classes of drugs for the treatment of infectious diseases. A major

C	L	M	J	B	7	3	8	2	Manuscript No.	Dispatch: 17.4.09	Journal: CLM	CE: Blackwell	PE: Prasanna



challenge is to find drugs that act against multiple multidrug-resistant strains.

The antimicrobial activity of a new antibacterial drug, *para*-guanidinoethylcalix[4]arene (CxI), has been tested and is presented here. This lead compound is a novel member of the family of cationic antibacterial compounds; it is a calixarene-based compound with four guanidinium functions, which may interact with the negatively charged bacterial cell wall. CxI shows high water solubility, with broad *in vitro* activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria [6]. Moreover, it is devoid of cytotoxicity against two eukaryotic cell lines, HaCaT and MRC-5. By contrast HX and CHX show effects on cell viability after only 24 h exposure [6; M. Grare and R. E. Duval, unpublished data].

The purpose of this study was: (i) to extend knowledge about the *in vitro* activities of two widely used antiseptics, HX and CHX, by testing them against 41 multidrug-resistant Gram-positive bacteria [15 *S. aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) or methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), 12 coagulase-negative staphylococci (CoNS), resistant or susceptible to methicillin, 14 *Enterococcus* spp., with or without *van* genes] and 30 multidrug-resistant Gram-negative bacteria (20 *Enterobacteriaceae*, with or without ESBL, and ten non-fermenting bacilli); and (ii) to investigate the potential of a new antibacterial drug, named CxI, against these pathogens.

Materials and Methods

Bacterial strains

Escherichia coli ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 and ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as reference strains following guidelines of the CLSI (formerly NCCLS) [7] and of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [8]. Other reference strains were chosen to represent susceptible strains corresponding to resistant clinical isolates tested: *Proteus mirabilis* ATCC 43071, *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324, *Providencia stuartii* ATCC 33672, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *S. epidermidis* ATCC 12228 and *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Also included were two VISA strains (Mu3 and Mu50) [9].

Sixty-nine clinical isolates were collected from University Hospital of Nancy: (i) 39 multidrug-resistant Gram-positive isolates including three MSSA, ten MRSA, 12 CoNS resistant ($n = 10$) or not resistant ($n = 2$) to methicillin and 14 *Enterococcus* spp., with or without *van* genes; (ii) 30 multidrug-resistant Gram-negative isolates including 20 ESBL-producing

or -non-producing isolates of *Enterobacteriaceae* and 10 non-fermenting bacilli.

Each isolate was from a different patient, and each was judged to be clinically significant when it was first recovered. Isolates were selected on the basis of their antimicrobial susceptibility profile. Antimicrobial resistances were determined by the automated instrument VITEK2 (bioMérieux, France). The presence of resistance genes was investigated by PCR multiplex analysis adapted from methods previously described by Dutka-Malen *et al.* [10] for *van* genes, or Del Vecchio *et al.* [11] for *mecA* genes. Strains were grown on Mueller Hinton agar (BD, 225250) or Mueller Hinton broth (MHB) (BD, 275730), complemented with 5% lysed sheep blood for the streptococci.

Antimicrobial agents

Three drugs were tested: hexamidine diisethionate (FW = 668.22; compound 1), chlorhexidine digluconate (FW = 847.74; compound 2), and *para*-guanidinoethylcalix[4]arene (FW = 1221.1; compound 3) (Fig. 1).

Compound 3 was prepared as trifluoroacetate salts as described previously [12]. Compounds 1 and 2 were obtained by evaporation and freeze-drying in commercial alcoholic solution at 1‰ (w/vol). The three compounds were fully characterized, and each batch was controlled by means of ^1H and ^{13}C NMR elemental analyses. Solutions were freshly prepared at the beginning of each week and kept at

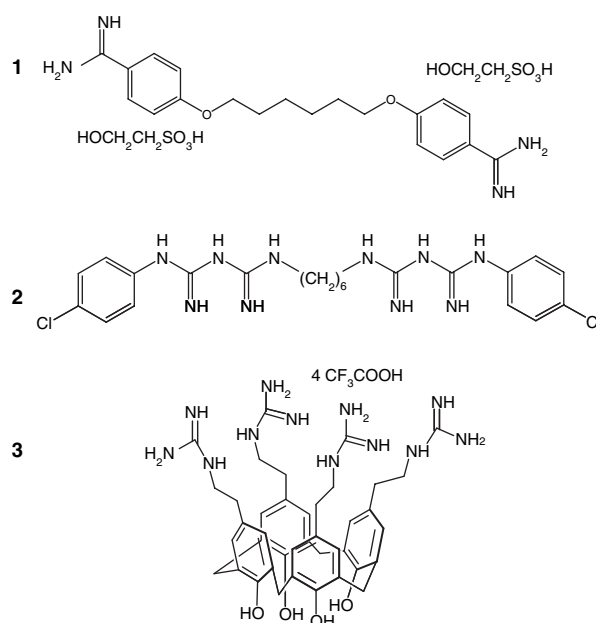


FIG. 1. Chemical structure of: (a) hexamidine diisethionate (HX); (b) chlorhexidine (CHX); and (c) *para*-guanidinoethylcalix[4]arene (CxI).

4°C. The solutions were filtered through a 0.22 µm-pore-size filter (Millex GP; 0.22 µm, Millipore, France) before each experiment.

MIC determination

MICs were determined using the broth microdilution method recommended by the CLSI [7], and as described previously [6]. For microdilution susceptibility testing of reference strains, assays were made in Mueller-Hinton media supplemented or not with magnesium (12.5 mg/L) and calcium (25 mg/L) in order to evaluate the influence of cations on MICs. Results are expressed as means of four independent determinations.

Results

The MICs of all compounds are provided in Tables 1–3. The presence of magnesium (12.5 mg/L) and calcium (25 mg/L) did not appear to affect the MICs, compared with those determined in unsupplemented MHB (data not shown).

For the two reference strains (*S. aureus* ATCC 25923 and ATCC 29213) and for three *mecA*-negative strains, the MIC of CxI was 4–8 mg/L (Table 1). No difference in activity was seen for ten *mecA*-positive strains or for the two VISA strains (Mu3 and Mu50) (MIC 4–8 mg/L for all strains). CxI showed better activity against CoNS (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. warneri*), independent of the resistance phenotype (MIC <1 mg/L of almost all strains, two *mecA*-negative and ten *mecA*-positive) (Table 1). HX showed more variable and moderate activity (MIC range <1–32 mg/L), with reduced activity against the VISA strains tested (MIC = 128–256 mg/L). CHX was the most active compound against staphylococci (MIC <1 mg/L for all strains).

Three *E. faecalis* strains (two *vanA*-positive), eight *E. faecium* strains (six *vanA*-positive and two *vanB*-positive) and one strain each of *E. avium* *vanB*, *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* were tested for susceptibility to CxI, HX and CHX. CxI was more active against *E. faecium* strains, whatever the resistance phenotype (MIC range 8–16 mg/L for *E. faecium*, vs. 64 mg/L for *E. faecalis* strains) (Table 1).

Both the species and the Van phenotype seemed to influence CxI efficacy with MICs of 8–64 mg/L for *vanA*+ strains, 4–16 mg/L for *vanB*+ strains (4 mg/L for *E. avium*), and of 2 and 16 mg/L, respectively, for strains of *E. gallinarum* (*vanC*I+) and *E. casseliflavus* (*vanC*2/*C*3+), both naturally non-susceptible to glycopeptides (Table 1). CHX and HX displayed very good activity against vancomycin-resistant

TABLE 1. *In vitro* activities of *para*-guanidinoethyl-calix[4]arene (CxI), hexamidine (HX) and chlorhexidine (CHX) against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci (CoNS), and *Enterococcus* spp., with various resistance phenotypes. (): number of strains tested

Strains	Tested agents	MIC (mg/L)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CxI	8
	HX	2
	CHX	<1
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CxI	8
	HX	<1
	CHX	<1
MSSA (3)	CxI	4–8
	HX	<1
	CHX	<1
MRSA (10)	CxI	4–8
	HX	<1–32
	CHX	<1
VISA (Mu3)	CxI	18
	HX	256
	CHX	<1
VISA (Mu50)	CxI	8
	HX	128
	CHX	<1
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	CxI	<1
	HX	<1
	CHX	<1
MS-CoNS (2)	CxI	<1
	HX	<1
	CHX	<1
MR-CoNS (10)	CxI	<1–2
	HX	<1–8
	CHX	<1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CxI	32
	HX	2
	CHX	<1
<i>E. faecalis</i>	CxI	64
	HX	4
	CHX	<1
<i>E. faecalis</i> <i>vanA</i> (2)	CxI	64
	HX	4
	CHX	<1–2
<i>E. faecium</i> <i>vanA</i> (6)	CxI	8–16
	HX	4
	CHX	<1–2
<i>E. faecium</i> <i>vanB</i> (2)	CxI	CxI
	HX	4
	CHX	8–16
<i>E. avium</i> <i>vanB</i>	CxI	4
	HX	8
	CHX	1
<i>E. gallinarum</i> (<i>vanC</i> I)	CxI	16
	HX	4
	CHX	2
<i>E. casseliflavus</i> (<i>vanC</i> 2/ <i>C</i> 3)	CxI	2
	HX	16
	CHX	2
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	CxI	16–32
	HX	<1
	CHX	<1

MSSA, methicillin-sensitive *S. aureus*; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*.

enterococci (VRE), irrespective of species or resistance phenotype (MIC range <1–2 mg/L of CHX, and 4–16 mg/L of HX) (Table 1).

Concerning antimicrobial activity against *Enterobacteriaceae*, more marked variations were observed whatever the compounds tested. As for CxI, good activity was noted against *Escherichia coli*, with particularly good efficiency against ESBL-producing clinical isolates (MICs 2–4 mg/L for all

TABLE 2. *In vitro* activities of para-guanidinoethylcalix[4]-arene (CxI), hexamidine (HX) and chlorhexidine (CHX) against Enterobacteriaceae, with various resistance phenotypes. (): number of strains tested

Strains	Tested agents	MIC (mg/L)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CxI	4
	HX	8
	CHX	<1
Penicillinase-producing <i>E. coli</i>	CxI	2
	HX	8
	CHX	<1
AmpC-hyperproducing <i>E. coli</i>	CxI	2
	HX	16
	CHX	<1
ESBL <i>E. coli</i> (4)	CxI	2
	HX	16–64
	CHX	<1–2
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	CxI	256
	HX	256
	CHX	16
Penicillinase-producing <i>P. mirabilis</i>	CxI	256
	HX	64
	CHX	2
<i>P. vulgaris</i>	CxI	64
	HX	16
	CHX	8
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 700324	CxI	16
	HX	16
	CHX	4
<i>K. pneumoniae</i>	CxI	8
	HX	64
	CHX	4
ESBL <i>K. pneumoniae</i> (2)	CxI	8–64
	HX	32–64
	CHX	2–4
<i>Citrobacter koseri</i>	CxI	4
	HX	16
	CHX	<1
<i>Providencia stuartii</i> ATCC 33672	CxI	64
	HX	64
	CHX	4
Fluoroquinolones-resistant <i>P. stuartii</i>	CxI	256
	HX	16
	CHX	<1
<i>Enterobacter cloacae</i>	CxI	256
	HX	>256
	CHX	8
AmpC-hyperproducing <i>E. cloacae</i>	CxI	>256
	HX	128
	CHX	8
ESBL <i>E. cloacae</i> CxI		32
	HX	256
	CHX	4
<i>Morganella morganii</i>	CxI	8
	HX	64
	CHX	8
AmpC-hyperproducing <i>Morganella morganii</i>	CxI	>256
	HX	32
	CHX	32
<i>Serratia marcescens</i>	CxI	>256
	HX	256
	CHX	32
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	CxI	16
	HX	32
	CHX	4
<i>Y. enterocolitica</i>	CxI	64
	HX	16
	CHX	8

Escherichia coli strains) (Table 2). Good activity was also observed against *K. oxytoca* ATCC 700324, *K. pneumoniae*, *Citrobacter koseri* and *Morganella morganii* (MICs = 16, 8, 4 and 8 mg/L, respectively) (Table 2). As for resistant clinical isolates, a significant decrease in activity was observed with

TABLE 3. *In vitro* activities of para-guanidinoethylcalix[4]-arene (CxI) and comparators against non-fermenting bacilli, with various resistance phenotypes. (): number of strains tested

Strains	Tested agents	MIC (mg/L)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	CxI	32
	HX	32
	CHX	4
Fluoroquinolones-resistant <i>P. aeruginosa</i>	CxI	32
	HX	32
	CHX	8
Porine D2-modified <i>P. aeruginosa</i>	CxI	64
	HX	64
	CHX	4
Multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i> (3)	CxI	64–256
	HX	32–64
	CHX	4–16
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	CxI	256
	HX	32
	CHX	8
Multidrug-resistant <i>A. baumannii</i> (2)	CxI	1128–256
	HX	32–64
	CHX	4–16
<i>Burkholderia cepacia</i>	CxI	18
	HX	<1
	CHX	<1
Multidrug-resistant <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2)	CxI	1 > 256
	HX	32–256
	CHX	<1–32

an 8–32-fold MIC increase (MIC = 8–64 mg/L for ESBL-producing *K. pneumoniae* and >256 mg/L for AmpC-overproducing *Morganella morganii*). As for *Enterobacter cloacae*, surprisingly only minimal activity of the compound was observed against the wild-type strain and against the AmpC-hyperproducing strain (MIC = 256 mg/L). However, greater activity was observed when the strain expressed an ESBL (MIC = 32 mg/L). Some *Enterobacteriaceae* showed a natural lack of susceptibility to CxI.

Those tested were: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens* and *Yersinia enterocolitica* (for these species, MICs were between 64 and >256 mg/L) (Table 2). Similar observations were made for HX, generally showing poor activity against *Enterobacteriaceae* (MIC ≥64 mg/L for almost all strains tested) (Table 2). Once again, CHX seemed to be the more active compound with very low MICs [<1 mg/L (for *Escherichia coli*, including ESBL-producing strains) to 32 mg/L (for AmpC-overproducing *Morganella morganii* and *Serratia marcescens*)] (Table 2).

To all compounds evaluated in this study, non-fermenting bacilli were the least susceptible. The MICs of CxI ranged from 32 to >256 mg/L (the more resistant strains were *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*) and the MICs of HX ranged from <1 to 32 mg/L (Table 3). *Burkholderia cepacia* seemed to be the more susceptible strain, whichever the compound tested (MICs of CxI, HX and CHX = 8, <1 and <1 mg/L, respectively (Table 3).

Discussion

The discovery and application of antimicrobial chemotherapy and the use of biocides in the form of antiseptics and disinfectants, particularly in the latter half of the 20th century, has allowed control over most infectious diseases. Cationic antibacterials such as CHX and QACs have been shown to be helpful in reducing the spread of multidrug-resistant strains and hospital-acquired infections [13]. CHX is a known antiseptic, active against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria, but few data are available about its activity against resistant clinical isolates. MIC values of CHX determined in this study were comparable to those obtained by other authors [14–16]. We have demonstrated under laboratory conditions that this antiseptic is active against various strains of MRSA, MR-CoNS, VRE and antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae*. Comparing the activity of CHX against such strains with that against non-fermenting bacilli, CHX activity was more variable with respect to genus and resistance phenotype, as previously described [15].

Nevertheless, a higher *in vitro* cytotoxicity of this antiseptic was observed in exposures of up to 24 h (M. Grare and R. E. Duval, unpublished data).

Moreover, other authors have demonstrated that CHX is highly cytotoxic *in vitro* (for osteoblastic, endothelial and fibroblastic cell lines) [17]. As for HX, this study confirms reduced activity compared with CHX, with the spectrum reduced to Gram-positive bacteria. Activity was observed against MRSA and VRE; this could be of interest in controlling the spread of these pathogens. However, HX and CHX also present high cytotoxicity during exposures of up to 24 h, in addition to reduced spectrum of activity [6]. These cumulative data provide supplementary arguments to investigate and research new compounds, with a comparable broad spectrum but lower cytotoxicity, and prompted the current investigation into a new cationic compound, CxI, against multidrug-resistant clinical isolates. In effect, CxI seemed to be a very interesting and potent antibacterial, with an extended spectrum, one larger than that of HX, but slightly narrower than that of CHX. Activity was obtained against MRSA, MR-CoNS, VRE and ESBL-producing *Enterobacteriaceae*; more remarkably, we have previously demonstrated that CxI is devoid of cytotoxicity *in vitro* [6]. Compared with HX and CHX, which are highly cytotoxic cationic antiseptics, the low cytotoxicity of CxI makes it a very promising new antibacterial agent.

Relating our data of CxI activity against clinical isolates to its mechanism of action, there appears to be no correlation between resistance to antibiotics (particularly multidrug

resistance) and CxI efficacy. This implies that the mechanism of action of CxI is independent of the antibiotic resistance phenotypes of the strains and isolates tested in this study. We consider it unlikely that β -lactamase production or a PLP-modification could influence the activity of CxI, a synthetic compound with a structure very different from that of β -lactams. Considering its chemical structure (Fig. 1c), one potential hypothesis for its mechanism of action is that the four guanidium functions interact with the negative charges of some specific components of the bacterial cell wall. This is suggested by the variation in activity observed between strains of the same genus or of the same species. Variations in MICs were more noticeable with Gram-negative strains, and the most striking variation was observed with *Enterobacteriaceae*. One of the characteristics of Gram-negative bacteria is the presence of the outer membrane (OM). This membrane is likely to be the first structure with which CxI interacts, and it is well known that the composition of the OM, and particularly of lipopolysaccharide (LPS), is highly variable among genera and species, even from one strain to another. The observed differences between clinical isolates suggest one or more physico-chemical interaction of the CxI with the membrane. These interactions must depend on the membrane composition, in particular the nature of the LPS, and membrane properties, such as charge density and membrane potential. Such differences in membrane composition and properties could explain differences in the MICs observed in this study for the various strains of *Enterobacteriaceae*. Considering the Gram-negative non-fermenting bacilli, it may be worth noting that MICs are increased for clinical isolates with active efflux-pumps relative to the reference strains (as in the case of *Pseudomonas aeruginosa*). The questions as to how CxI penetrates the OM, and how this compound can be extruded by efflux systems, warrant further investigations into the structure of the bacterial cell wall.

Finally, we consider it unlikely that β -lactamases, or other enzymes that have specific affinity for antibiotics, have any influence on the activity of CxI. It may be more pertinent to address the resistance of *Enterococcus* spp. to glycopeptides, since this type of resistance implies a modification of the composition of the peptidoglycan (lactate or serine, instead of alanine), and of the degree of its reticulation.

Such modifications could potentially lead to altered interactions with CxI. These 'minor' modifications in the composition of the peptidoglycan could perhaps also explain the observed differences in CxI activities against *E. faecium* and *E. faecalis*. Indeed, differences in terms of amino acid content are revealing, i.e. the presence of chains of lysine-aspartate in all *Enterococcus* spp. except for chains of lysine-alanine in

E. faecalis (strains for which the MICs of CxI were higher) [15][18].

This probably results in modification of charges and peptidoglycan organization, and then, considering our hypothesis for the mechanism of CxI action, in differences in its activity.

In conclusion, we have demonstrated that (i) the antibiotic-resistant pathogens tested here have patterns of elevated susceptibility to HX or CHX, and (ii) CxI can present a good alternative to these two older antiseptics, which are characterized by higher cytotoxicity. Also, in line with previous observations [19], we confirm that the bacterial cell wall is a potential target of CxI.

However, more detailed studies are necessary to understand mechanism(s) of action of CxI; they should include the analysis of structure/activity relationships, of synergy with antibiotics, and of peptidoglycan modification(s) in the presence of CxI. So far, the results presented here support the hypothesis that CxI could represent a novel cationic compound that in our opinion may be valuable as an adjuvant for antimicrobial chemotherapy or disinfection.

Acknowledgements

This work was presented in part at the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract no. 2071, Chicago, IL, 17–20 September 2007. The authors thank A. Lozniewski for providing clinical isolates (Bacteriology Laboratory, CHU Nancy, France).

Transparency Declaration

Financial support was provided by the MRES, CNRS. The authors declare no conflicts of interest.

References

- Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 2005; 99: 703–715.
- Kratzer C, Tobudic S, Graninger W, Buxbaum A, Georgopoulos A. *In vitro* antimicrobial activity of the novel guanidine Akacid Plus. *J Hosp Infect* 2006; 63: 316–322.
- Sheldon AT. Antiseptic “resistance”: real or perceived threat? *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1650–1656.
- Sekiguchi JI, Hama T, Fujino T *et al.* Detection of the antiseptic- and disinfectant-resistance gene *qacA*, *qacB* and *qacC* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolated in a Tokyo hospital. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57: 288–291.
- Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2797–2803.
- Grare M, Mourer M, Fontanay S, Regnoul-de-Vains JB, Finance C, Duval RE. *In vitro* activity of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 575–581.
- Clinical Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A6*. PA, USA: NCCLS Wayne, 2003.
- CA-SFM. *Communiqué 2008 (Edition janvier 2008)*. <http://www.sfm-assoc.fr/> (last accessed xx Xxxx 200X).
- Cui L, Murakami H, Kuwahara-Akai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2276–2285.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 24–27.
- Del Vecchio VG, Petroziello JM, Gress MJ *et al.* Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2141–2144.
- Mourer M, Duval RE, Finance C, Regnoul-de-Vains JB. Functional organisation and gain of activity: The case of the antibacterial *para*-guanidinoethylcalix[4]arene. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 2960–2963.
- Crawford AG, Fuhr JP, Bhaskar R. Cost-benefit analysis of chlorhexidine gluconate dressing in the prevention of catheter-related bloodstream infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 668–674.
- Block C, Furman M. Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment. *J Hosp Infect* 2002; 51: 201–206.
- Buxbaum A, Kratzer C, Graninger W, Georgopoulos A. Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide Akacid Plus®. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 193–197.
- Irizarry L, Merlin T, Rupp J, Griffith J. Reduced susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to cetylpyridinium chloride and chlorhexidine. *Chemotherapy* 1996; 42: 248–252.
- Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In vitro* 2007; 22: 308–317.
- Bouvet A, Schlegel L, Loubinoux J. *Streptococcaceae: Streptococcus, Abiotrophia, Granulicatella, Enterococcus* et autres genres apparentés. In: Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, eds. *Précis de Bactériologie Clinique*, 2nd edn. Paris: ESKA editions, 2007: 845–897.
- Grare M, Lafosse S, Regnoul-de-Vains JB, Finance C, Duval RE. Interest of a fluorochrome-based flow cytometry approach to evaluate impact of antibacterial drugs on bacterial cell wall. Washington, DC, USA: Abstract # F2-376, 48th ICAAC, 25–28 October 2008.

Chapitre 3

CMI & SELS DE TETRAZOLIUM

GRARE ET AL., 2008, JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS. 75:156-159.

I. OBJECTIFS

La méthode de microdilution en milieu liquide a depuis longtemps été adoptée pour la détermination des CMI : elle est peu coûteuse, facile à réaliser, et permet d'obtenir des résultats reproductibles en des délais courts. Cependant, la lecture visuelle manque d'objectivité et de précision, et la turbidimétrie par photomètre peut être gênée par certains additifs ou composés bactériens qui peuvent affecter la couleur du milieu de culture, ainsi que par l'agrégation des bactéries [Eloff, 1998]. Les méthodes colorimétriques peuvent ainsi représenter une alternative intéressante. Les sels de tétrazolum sont depuis longtemps utilisés comme indicateurs colorimétriques ; les bactéries ou les champignons les convertissent en cristaux de formazan, qui peuvent alors être quantifiés. Les sels de tétrazolum sont réduits par les deshydrogénases et les cristaux insolubles de formazan formés dans le cas du 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) sont solubilisés dans le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate). Aucune solubilisation n'est nécessaire pour le 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT). Ce sont ces deux sels de tétrazolum que nous avons décidé d'évaluer.

Nous avons rencontré des problèmes de croissances des souches d'*Enterococcus* spp. (absorbance de la suspension bactérienne après 18-24 h de croissance en milieu Mueller Hinton < 0,1) ; par ailleurs, certaines souches exigeantes (*Streptococcus* spp. ou *Listeria monocytogenes*) nécessitent la réalisation des CMI en milieu Mueller Hinton + 5% de sang de mouton hémolysé, ce qui rend particulièrement difficile la lecture de la CMI. Nous souhaitons trouver une méthode rapide, simple et peu coûteuse, permettant de faciliter cette lecture.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer la pertinence de l'ajout de sels de tétrazolum à la technique de microdilution en milieu liquide pour la détermination de la CMI.

II. RÉSULTATS & DISCUSSION

GRARE ET AL., 2008, JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS. 75:156-159.

L'addition de sels de tétrazolum ne permet pas d'améliorer ou de faciliter la lecture de la CMI, quelque soit la souche considérée (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*). En conséquence, nous avons décidé d'abandonner cette technique.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth



Note

Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: Why? Which salt to select? How?

Marion Grare, Stéphane Fontanay, Coralie Cornil, Chantal Finance, Raphaël Emmanuel Duval *

SRSMC, Nancy-University, CNRS, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2007
Received in revised form 7 May 2008
Accepted 8 May 2008
Available online 15 May 2008

Keywords:

Tetrazolium salts
Bacteria
MIC determination

ABSTRACT

We reported evaluation of a colorimetric MIC assessment for routine susceptibility testing of non-fastidious bacteria, with addition of growth indicators (INT and MTT). Our results made us postulate that the use of such indicators was unnecessary for MIC determination in routine microdilution method.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Evaluation of bacteriostatic and bactericidal activities is essential for the assessment of susceptibility to antimicrobial drugs before treatment and for screening of new drugs. Microbial growth or its inhibition can be measured by a number of ways, e.g. viable counts, direct microscopic counts, turbidity measurement, bioluminescence and fluorimetry. Broth macro- or microdilution methods for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination are recommended by CLSI (NCCLS, 2003). We have adopted the micromethod since it is less expensive and less cumbersome than the microdilution method and it yields reproducible results. Furthermore, the use of microplates allows large amounts of data to be generated quickly. Bacterial growth could be assessed either visually by grading turbidity or better spectrophotometrically by measuring optical density. However, on one hand, visual assessment of bacterial growth lacks objectivity and precision; on the other hand, the accuracy of spectrophotometric readings may be hampered by (i) additives or antibacterial compounds that affect the spectral characteristics of growth media, (ii) the aggregation of bacteria, or (iii) bacterial pigments (Eloff, 1998). Bioluminescence or fluorimetry measurements are sensitive but demand expensive equipment and can require extensive laboratory work prior to each assay. Consequently few conventional methods of antimicrobial susceptibility testing are both precise and reproducible when applied to bacteria that have specific

growth requirements or a slow rate of growth. In this context, colorimetric methods could represent an alternative approach. Tetrazolium salts have been used as colorimetric indicators, since bacteria or fungi convert them to colored formazan derivatives that can be quantified. In the present study, we developed a colorimetric assay for MIC determination, based on two different tetrazolium salts, namely 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyl-tetrazolium chloride (INT), by standardizing various factors that influence tetrazolium conversion. Objectives of this study were (i) to determine if the use of tetrazolium salts could enhance the sensitivity and accuracy of MIC determination by broth microdilution method for enterococci and streptococci which have specific growth requirements; (ii) which salt is the most appropriate; (iii) which concentration of salt must be used; (iv) whether all bacterial species need the same conditions for the tetrazolium salt assay; and (v) to verify the relation between inoculum size and the amount of formazan produced in relation to incubation time.

Before starting experiments, we determined which wavelength is the most appropriate for each assay, in order to avoid perturbation due to broth components, especially for Mueller Hinton with 5% lysed sheep blood. The ideal wavelength for determining formazan production, should be negative in broth and tetrazolium salt absorbance spectra. Our results (data not shown) indicated that the most appropriate wavelengths were 492 nm and 540 nm for INT and MTT assay respectively, when realized in MH broth, and 620 nm for MTT assay in MHS broth.

Escherichia coli ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

* Corresponding author. Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament (GEVSM), UMR 7565, Nancy-University, CNRS (SRSMC), Faculty of Pharmacy, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France. Tel.: +33 3 83 68 23 36; fax: +33 3 83 68 23 57.

E-mail address: raphael.duval@pharma.uhp-nancy.fr (R.E. Duval).

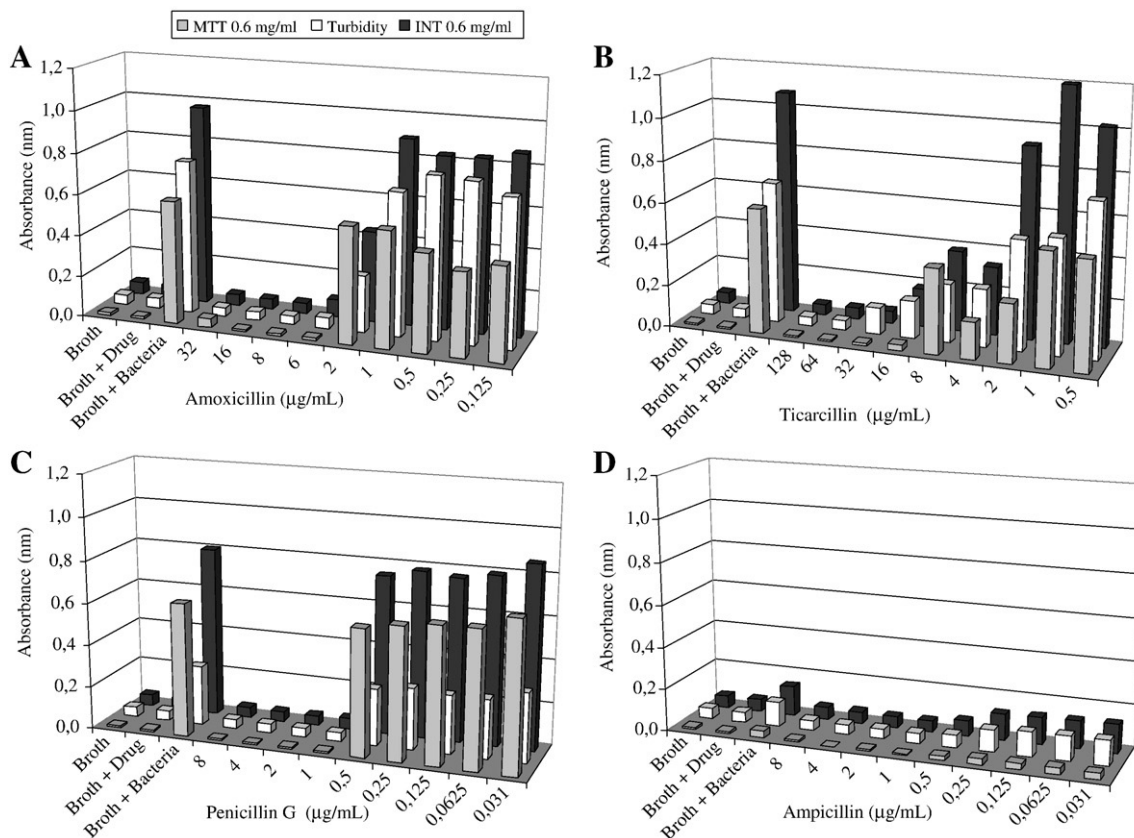


Fig. 1. Comparison three assays: turbidimetry (540 nm), INT 0.6 mg/mL (492 nm) or MTT 0.6 mg/mL (540/690 nm). A: *E. coli* vs. amoxicillin; B: *P. aeruginosa* vs. ticarcillin; C: *S. aureus* vs. benzylpenicillin; D: *E. faecalis* vs. ampicillin.

27853, and *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 were used as reference strains following guidelines of the CLSI (formerly NCCLS) (NCCLS, 2003) and of the CA-SFM (CA-SFM, 2008). Two clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus pyogenes* were also studied. Strains were maintained on Mueller Hinton agar (Difco, 225250) or Mueller Hinton broth (MH) (Difco, 275730), complemented with 5% lysed sheep blood (MHS) for the streptococci.

MTT (Sigma 1350380), and INT (Sigma 08428MC) were dissolved in PBS to obtain final concentrations of 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 and 0.1 mg/mL. After turbidity measurement, 10 μ L of each MTT or INT solution were added to each well and plates were incubated at 35 $^{\circ}$ C for 20 min. Then, insoluble purple formazan obtained with MTT was dissolved by added 100 μ L SDS to each well, while with INT no dissolution was necessary and absorbance was measured directly. Very low conversion rates were observed with measurements of 0.1 and 0.2 mg/mL, whatever the tetrazolium salt and strain tested (data not shown). Among the different concentrations of MTT and INT evaluated, relatively high conversion rates were generated with the concentration of 0.6 mg/mL. In addition, the formazan production at this concentration was high within 20 min exposure without exceeding the detection limit of the spectrophotometer and low background absorbance was obtained (data not shown). Beyond 0.6 mg/mL absorbance was over 1.4, and no correlation between signal and amount of formazan formed can be made. So, according to our results and previous observations (Weseler et al., 2005), a concentration of 0.6 mg/mL was chosen for the further investigations.

Fig. 1 presents MIC results obtained for four reference strains (*E. coli* ATCC 25922; *P. aeruginosa* ATCC 27853; *S. aureus* ATCC 29213; *E. faecalis* ATCC 29212). Antibiotics tested were the same as those used for routine antimicrobial testing. They were supplied by the manufacturers as base powders of known biological activity. These

included amoxicillin, ampicillin, ticarcillin and benzylpenicillin (e.g. penicillin G), dissolved in distilled water at a final concentration of 10 mg/mL. Stock solutions of each antibiotic were freshly prepared at the beginning of each week and kept frozen at +4 $^{\circ}$ C. The solutions were filtered through a 0.22 μ m-pore-size filter (Millex[®]GP, 0.22 μ m, Millipore, France) before each experiment. Fig. 1 demonstrated no gain in sensitivity whatever tetrazolium salts were used: with INT and MTT assays, MIC values were similar to those obtained with turbidity measurements. For Gram-negative bacteria, easiness of MIC determination is not improved by tetrazolium salt addition: turbidity absorbance was already high and no gain of signal was obtained with

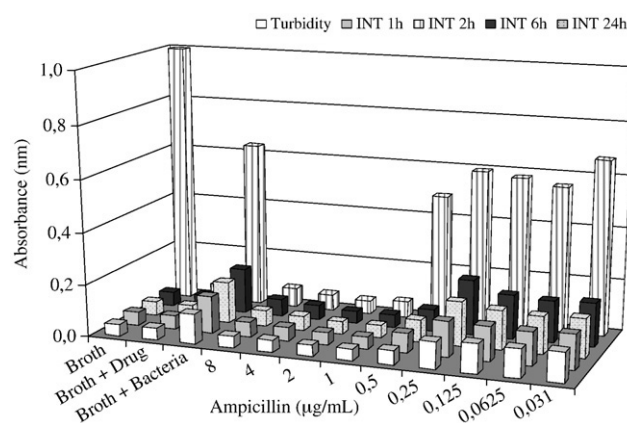


Fig. 2. Evolution of formazan production in function of incubation time, with INT 0.6 mg/mL, for *E. faecalis* ATCC 29212.

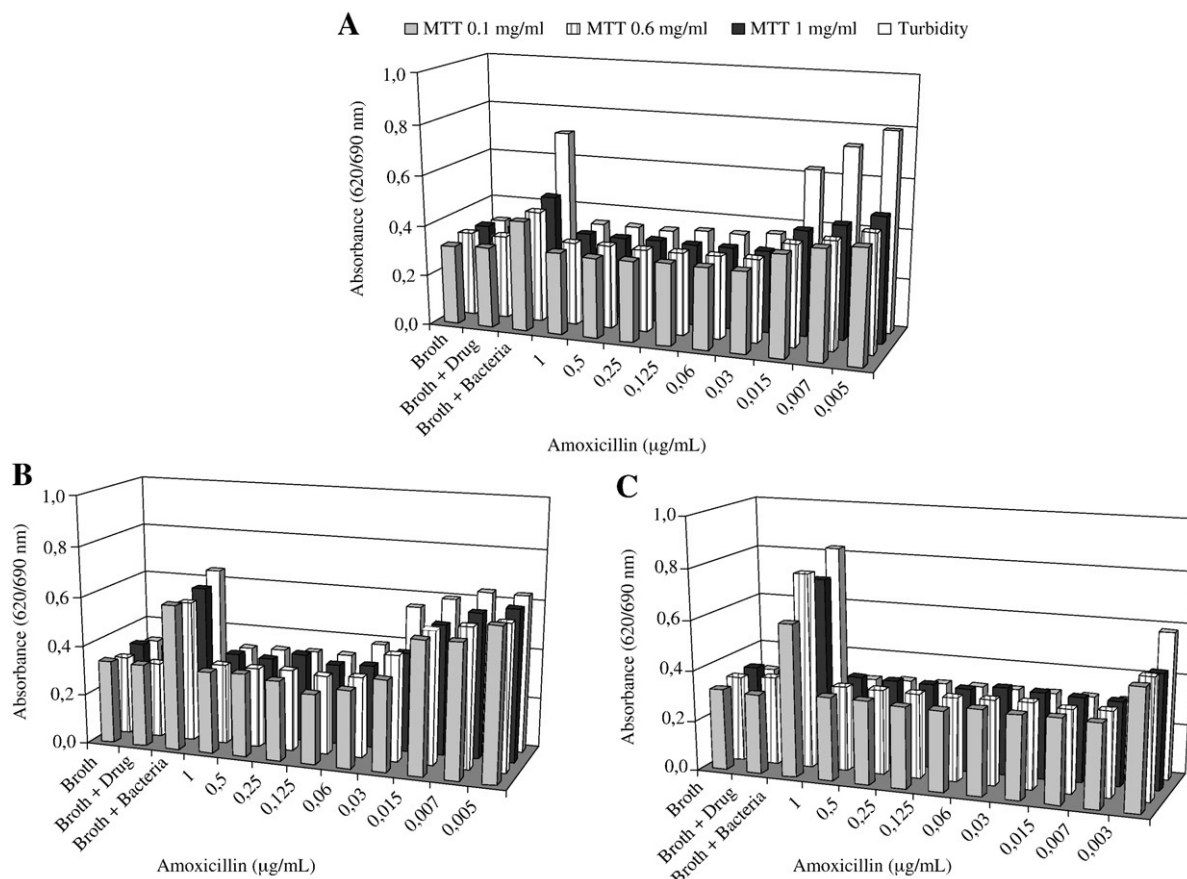


Fig. 3. Comparison of turbidimetry and MTT (0.1; 0.6 and 1 mg/mL) assays, for three fastidious strains, vs. amoxicillin. A: *S. pneumoniae* ATCC 49619; B: *S. agalactiae*; C: *S. pyogenes*.

INT (weak augmentation of signal) or MTT (attenuated signal probably due to cell lysis with SDS) (Fig. 1A and B). For *S. aureus*, a real improvement was obtained with a doubling of the absorbance in comparison with turbidity (0.6 to 0.8 vs. 0.3) (Fig. 1C), which facilitates reading. Surprisingly, for *E. faecalis*, no conversion of the tetrazolium salt (INT or MTT) in formazan was observed, no coloration was visible after 20 min incubation (Fig. 1D). So, no improvement of MIC determination was obtained.

As use of INT is more convenient, influence of incubation time for *E. faecalis* was evaluated by monitoring INT conversion (0.6 mg/mL) after 1, 2, 6 and 24 h. In comparison with turbidity, gain of sensibility was obtained only after 24 h of incubation. A difference of one MIC dilution was observed: 0.5 instead of 0.25 µg/mL of ampicillin (Fig. 2). However, this result should be considered with caution for two reasons. On one hand, broth control showed a very high absorbance, higher than bacteria control. After classical control experiments, no contamination was found. This phenomenon was observed for all experiments ($n=5$), without any explanation. On the other hand, if INT is considered not to be toxic for bacteria, MIC may be better after 48 h instead of 24 h. Other strains of *Enterococcus* spp. were tested and similar results were obtained (data not shown). These bacteria required no specific growth requirements but grew slowly, and weak absorbance is obtained with turbidimetry. No improvement is noted with the use of indicator. Our results are in agreement with previous ones (Gabrielson et al., 2002; Al-Bakri and Affi, 2007), so that such assays seem to be not particularly useful for enterococci. Moreover, such assay significantly increased the time allowed for giving results, and in a clinical bacteriology laboratory, rapidity is really important for diagnosis and treatment.

Otherwise we wanted to evaluate the relation between number of bacteria and amount of formazan produced. So an INT solu-

tion 0.6 mg/mL was added to different inocula of *E. coli* ATCC 25922 (10^1 to 10^8 CFU/mL), and absorbance was measured at different incubation times (1 to 4 h). We observed that formazan production was a function of inoculum size (data not shown): a large amount is obtained with 10^6 , 10^7 , 10^8 and 10^9 CFU/mL and decreased rapidly with this number of bacteria (absorbance <0.2). For all inocula, formazan production increased with incubation time. Between 10^7 and 10^9 CFU/mL, 1 h incubation was sufficient to obtain a good signal. Below these values, 3 or 4 h were necessary. The relation between inoculum and amount of formazan formed was exponential.

Finally, similar results were obtained with the *S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. agalactiae* and *S. pyogenes* (Fig. 3). No correlation between tetrazolium salt concentration and absorbance intensity was documented: very low conversion rates were observed for all concentrations tested. An attenuated signal was obtained, particularly for *S. pneumoniae*, probably due to cell lysis with SDS (Fig. 3A). For other strains, turbidity absorbance was already high and no gain of signal was obtained with MTT (Fig. 3B and C); on the contrary, addition of SDS resulted in a greatly decreased absorbance, and the signal obtained was weaker than turbidity.

In conclusion, MTT and INT-based susceptibility testing in 96-wells microplates does not optimize determination of MIC breakpoints. The new assays are to be devoid of success for the strains tested. We do not recommend the use of MTT or INT for clinical bacteriological laboratories in routine susceptibility testing or for the identification and evaluation of new antibacterial compounds.

Acknowledgements

We are grateful to the MRES, CNRS for financial support.

References

- Al-Bakri, A.G., Affi, F.U., 2007. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J. Microbiol. Methods* 68, 19–25.
- CA-SFM, Communiqué 2008 (Edition janvier 2008). <http://www.sfm.asso.fr>.
- CLSI (NCCLS), 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard M7-A6, 6th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA.
- Eloff, J.N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 64, 711–713.
- Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., Möllby, R., 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J. Microbiol. Methods* 50, 63–73.
- Weseler, A., Geiss, H.K., Saller, R., Reichling, J., 2005. A novel colorimetric broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. *Pharmazie* 60, 498–502.

Chapitre 4

CINETIQUE D'ACTIVITE & BACTERICIDIE

GRARE ET AL., 2009C, PATHOLOGIE BIOLOGIE. SOUMIS.

I. OBJECTIFS

Il est indispensable de déterminer si l'activité d'une nouvelle molécule est bactéricide ou bactériostatique. Pour cela, nous avons mesuré la CMB par technique de microdilution en milieu liquide puis dénombrement des colonies sur milieu gélosé [Grare et al., 2007a]. Cependant, les résultats étaient peu reproductibles, et nous avons observé à plusieurs reprises, un « effet paradoxal » ; c'est-à-dire l'absence de croissance des bactéries à une concentration donnée, et la croissance à une concentration plus forte (sans que ces effets paradoxaux aient une reproductibilité). Nous avons donc décidé d'évaluer le caractère bactéricide de notre molécule, le Cx1, par la technique des courbes de bactéricidie (« time-kill curves »). L'activité du Cx1 est mesurée au cours du temps, par numération du nombre de survivants par comparaison à un témoin non traité. Les résultats ont présentés sous forme de courbes reliant le logarithme du nombre d survivants au temps.

L'objectif de cette étude est donc de déterminer l'effet antibactérien (bactériostatique ou bactéricide) du Cx1 par la technique de courbes de bactéricidie, *in vitro*.

II. MATÉRIELS & MÉTHODES

II.1. Matériels & Réactifs

Seringue de 10, 20 ou 50 mL

Filtre 0,22 μm (filtres Millex®GP, 0,22 μm , Millipore, France)

Tubes Falcon 15 et 50 mL

Pipettes stériles de 5, 10 et 25 mL

Fioles jaugées 50 mL

Aérotroton (35°C, 150 rpm) (Infors SARL, Massy, France)

Géloses Mueller Hinton (Difco, 225250)

Bouillons Mueller Hinton (Difco, 275730)

Solution de la drogue à tester : Cx1 ($M = 1221,11 \text{ g/mol}$) fournie par le Pr. Regnouf de Vains, sous forme de poudre blanche, reprise en eau distillée stérile et filtrée sur 0,22 μm pour obtenir une solution

stérile à 10^{-2} mol/L. Nous nous sommes procuré les antibiotiques commerciaux par les fabricants, sous forme de poudre stérile, prête à l'emploi.

III.2. Souches bactériennes étudiées

Quatre souches de référence ont été utilisées, correspondant à celles étudiées pour les CMI et les CMB : *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATC 25923 & ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Du fait de la difficulté de croissance d'*E. faecalis* ATCC 29212, et de la faible activité du Cx1 sur cette souche, il a été décidé de ne pas réaliser les courbes de bactéricidie pour cette souche.

III.3. Mode opératoire

J-1 : Mise en culture des bactéries sur gélose MH

Incuber 24 h à 35°C.

J0 : Ensemencement d'un bouillon MH

Prélever une colonie « moyenne » sur la gélose J-1 et ensemencer 5 mL de bouillon MH.

Incuber 24 h à 35°C.

J1 : Réalisation de la cinétique de bactériodie

≈ Préparation de la solution de drogue à tester

Préparer une solution mère de molécule à tester, dix fois concentrée, dans de l'eau distillée stérile. Agiter vigoureusement au vortex pour bien homogénéiser la solution. Filtrer cette solution sur 0,22 μm . Dans un tube Falcon 50 mL, préparer une solution de concentration équivalente à 0,5 à 8 fois la CMI, sous un volume de 30 mL de MH. Transférer cette solution dans un erlen stérile de 50 mL, bouché avec du coton cardé ou avec un bouchon rouge à vis.

≈ Préparation de la suspension bactérienne

Transférer le contenu du tube en verre dans un tube Falcon 15 mL. Centrifuger 10 min à 4500 g.

Éliminer le surnageant. Reprendre le culot dans 1 mL eau distillée stérile.

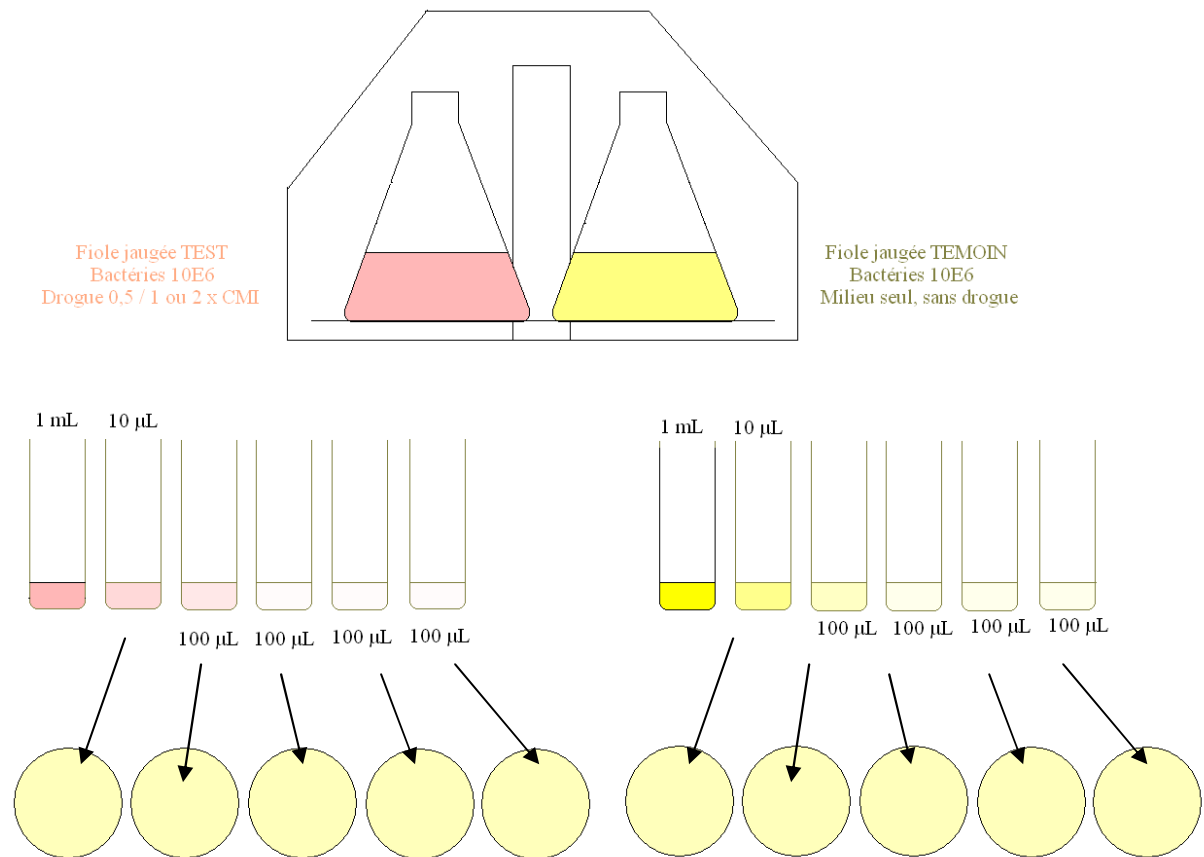


Figure 59 : Schéma du principe de la technique des courbes de bactéricidie.

Réaliser une dilution au $1/3000^{\text{ème}}$: 10 μL de la suspension bactérienne dans les 30 mL de milieu MH contenant la drogue à tester (pour *E. coli*, qui a une vitesse de dédoublement très rapide, évaluer le trouble de la suspension bactérienne initiale et ajouter 2-3 μL dans 30 mL au maximum). Cela permet d'obtenir un inoculum entre 5.10^{-5} et 5.10^{-6} bactéries/mL.

☺ **Pour chaque manipulation, réaliser un TEMOIN: 30 μL de suspension bactérienne dans 30 mL de milieu MH sans drogue.**

≈ Prélèvements à t = 0, 2, 4, 8, 12 et 24 h (voire 48 h) après la mise en contact drogue/bactéries

Déposer les trois erlens TEST + TEMOIN dans l'Aérotrotron à 35°C et sous agitation (150 rpm).

T = 0 h (Figure 59)

Arrêter l'agitation de l'Aérotrotron, transférer les erlens sous la PSM.

Faire un prélèvement de 1 mL dans chacun des erlens, dans un tube Falcon stérile de 15 mL.

- réaliser une dilution de la suspension bactérienne au $1/1000^{\text{ème}}$: 10 μL + 1000 μL d'eau distillée stérile : tube Falcon noté 10^{-3} ;
- procéder ensuite à une série de dilution au $1/10^{\text{ème}}$ (100 μL de la dilution précédente dans 900 μL de milieu MH), afin d'obtenir les dilutions suivantes en tube Falcon : 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .

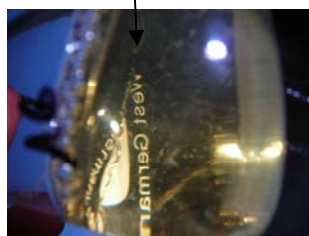
Déposer 100 μL de chacune de ces dilutions au centre de deux géloses MH, préalablement ramenées à température ambiante. Faire un étalement au râteau et laisser sécher les boîtes couvercle fermé pendant quelques minutes (cela évite d'avoir un étalement sous forme d'amas, ce qui rend le dénombrement impossible).

Incuber 24 h à 48 h (les colonies sont alors plus volumineuses, et donc plus faciles à dénombrer, en particulier pour les cocci à Gram +) à 35°C.

T8



T12



Présence d'agrégats

T24



T48



Figure 60 : Exemple d'évolution de la croissance bactérienne lors de la réalisation des courbes de bactéricidie du Cx1 sur *E. coli* ATCC 25922.

Avec ce qui reste de la suspension bactérienne prélevée :

- remplir 8 puits d'une plaque 96 puits avec 100 μ L de la suspension. Lire l'absorbance à 540 nm et tracer la courbe absorbance = f(temps) en faisant une moyenne de l'absorbance sur les 8 points ;
- si nécessaire : prélever quelques gouttes pour réaliser une coloration de Gram, ou un marquage fluorescent (IP/SYTO9, kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting kit, Ref. L34856, Invitrogen). La technique de marquage sera développée dans le Chapitre 8 consacré à la cytométrie en flux.

T = 2, 4, 8, 12, 24, 48 h

Procéder de la même façon qu'à T = 0 h.

J2 et J3 : Dénombrement des colonies. Comparaison par rapport au témoin non traité.

La drogue est considérée bactéricide si l'on observe une diminution d'au moins 3 log de l'inoculum bactérien.

III. RÉSULTATS

Ce travail a par ailleurs fait l'objet de communications affichées internationales :

5. **Grare M.**, Fontanay S., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.-B., Finance C., Duval R.E. Cinétique d'action du para-guanidinoéthylcalix[4]arène. 28^{ème} RICA, 4-5 décembre 2008, Paris, France.
6. **Grare M.**, Fontanay S., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.-B., Finance C., Duval R.E. Time-kill analysis and kinetic of membrane permeability modifications of *Escherichia coli* during exposure to Cx1, a new antibacterial drug. 49th ICAAC, September 12-15th 2009, San Francisco, Etats-Unis. Soumis.
7. **Grare M.**, Fontanay S., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.-B., Finance C., Duval R.E. Time-kill analysis and kinetic of membrane permeability modifications of *Pseudomonas aeruginosa* during exposure to Cx1, a new antibacterial drug. 49th ICAAC, September 12-15th 2009, San Francisco, Etats-Unis. Soumis.
8. **Grare M.**, Fontanay S., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.-B., Finance C., Duval R.E. Time-kill analysis and kinetic of membrane permeability modifications of *Staphylococcus aureus* during exposure to Cx1, a new antibacterial drug. 49th ICAAC, September 12-15th 2009, San Francisco, Etats-Unis. Soumis.

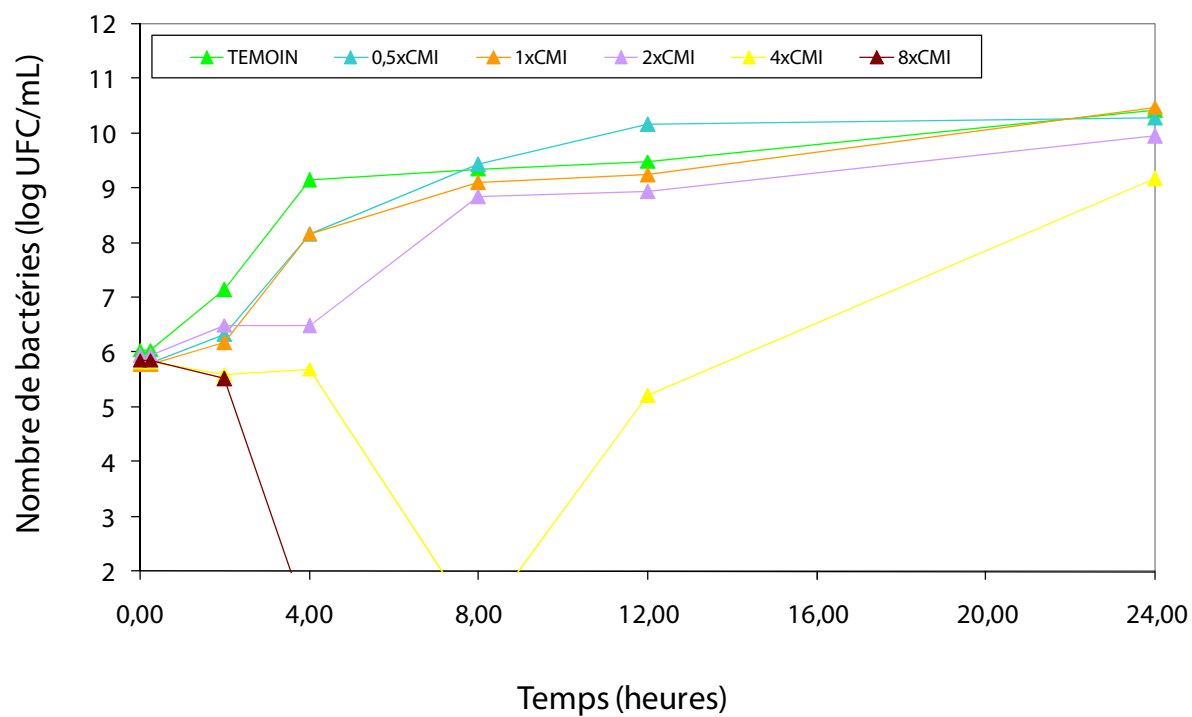


Figure 61 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur *E. coli* ATCC 25922 à 0,5x, 1x, 2x, 4x et 8x la CMI sur une période de 24 h (n = 4). La limite de détection est fixée à 2 log UFC/mL.

Figures 60 à 67 sont présentées les courbes de bactéricidie obtenues pour les différentes souches. Les courbes présentées correspondent à la moyenne de 3 ou 4 expériences pour chacune des concentrations testées. Un exemple d'évolution de la croissance bactérienne lors de la réalisation des courbes de bactéricidie pour *E. coli* ATCC 25922 est présenté Figure 60.

Les courbes de bactéricidie obtenues pour *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213 montrent un **effet bactéricide concentration-dépendant du Cx1**, à 4x et 8x (pour *E. coli*) la CMI, concentrations permettant d'obtenir la meilleure activité à 2 h pour les quatre souches testées. L'activité bactéricide (limite de détection 99,9%) est distincte et statistiquement différente à 2 h et à 24 h, lorsque le Cx1 est évalué à la concentration de 0,5x CMI (absence totale d'effet quelque soit la souche testée), et à 4x la CMI (réduction rapide de l'inoculum), pour les 4 souches testées. Une réduction de l'inoculum bactérien n'est pas détectée pour la concentration sub-inhibitrice de 0,5x la CMI (à l'exception de *P. aeruginosa*), et avec les concentrations de 1x et 2x la CMI pour *E. coli* et *S. aureus* ATCC 29213. Une reprise de la croissance est observée à 4x la CMI pour *E. coli* et *P. aeruginosa* à 12 h et 24 h respectivement, à 2x la CMI pour *S. aureus* ATCC 25923 ; aucun phénomène de re-croissance n'est observé pour *S. aureus* ATCC 29213. Lorsqu'un effet bactéricide rapide est obtenu, cet effet persiste jusqu'à 48 h, sans observation de re-croissance au bout de ce délai (données non présentées).

Les profils de bactéricidie obtenus pour les différentes souches sont détaillés ci-après.

III.1. Courbes de bactéricidie de *E. coli* ATCC 25922

Les courbes de bactéricidie obtenues pour *E. coli* ATCC 25922 montrent **une activité bactéricide de type concentration-dépendante**, avec un effet maximal obtenu à 8x la CMI, concentration permettant d'obtenir **un effet bactéricide en moins de 4 h**. Un effet bactéricide est observé à 8 h à 4x la CMI ; mais avec une reprise de la croissance à 12 h (Figure 61). A 2x la CMI, un ralentissement de la croissance bactérienne est observé jusqu'à 4 h ; à partir de 8 h, le profil est ensuite similaire à celui du témoin. Aucun effet n'est observé pour les concentrations correspondant à 0,5x et 1x la CMI (profils similaires à celui du témoin non traité).

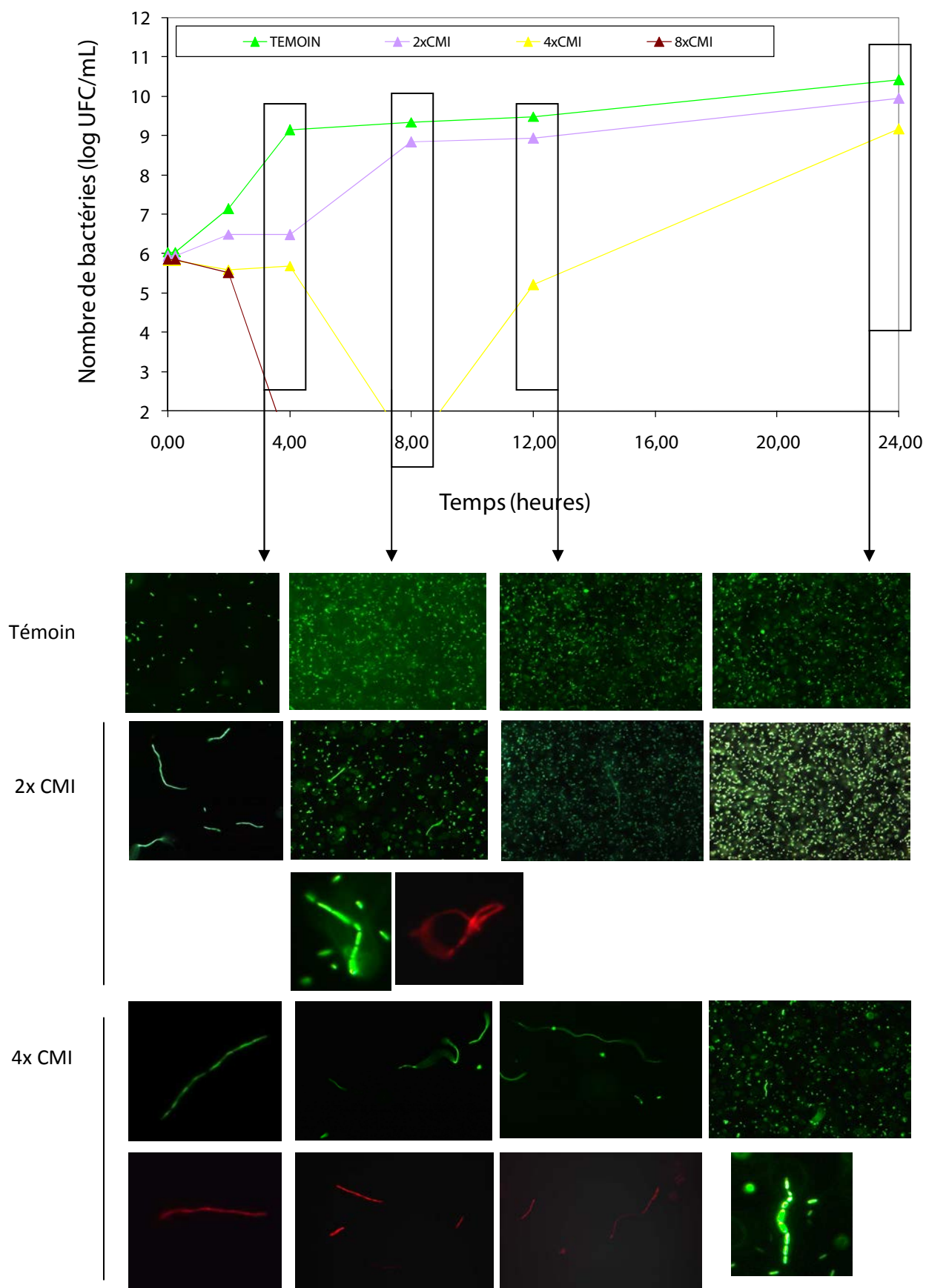


Figure 62 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur *E. coli* ATCC 25922 à 2x, 4x et 8x la CMI sur une période de 24 h (n = 4). Comparaison avec l'évolution du marquage IP/SYTO9, observation des bactéries au microscope à fluorescence.

Mais que se passe-t-il ? Pour en savoir plus, nous avons suivi l'évolution de la perméabilité et de l'intégrité membranaire, afin de faire le lien entre les effets du Cx1 au niveau pariétal et leur retentissement sur la croissance bactérienne. Ainsi, aux différents temps et aux différentes concentrations testées, des marquages fluorescents (SYTO9 et iodure de propidium, IP) ont été réalisés à l'aide du kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting® kit (Invitrogen). Ces deux fluorochromes se fixent au niveau des acides nucléiques : le SYTO9 est capable de pénétrer à l'intérieur des bactéries présentant une membrane intacte (bactéries « vivantes » marquées en vert) ; l'IP pénètre dans les bactéries uniquement lorsque la perméabilité membranaire est altérée (bactéries « mortes », marquées en rouge). Après 15 min de contact à l'abri de la lumière, les bactéries étaient observées au microscope à fluorescence (pour un protocole de marquage plus détaillé, voir chapitre 8 CMF). Les résultats sont présentés Figure 62.

Le marquage du témoin non traité, nous permet de mettre en évidence la multiplication de *E. coli* entre T0 et T24 : petits bacilles réguliers, marquées par le SYTO9, très peu de bactéries marquées par l'IP.

A 2x la CMI, le Cx1 entraîne dès 2 h une filamentation, les bactéries étant marquées par le SYTO9, sans marquage par l'IP, et ce jusqu'à 4 h d'incubation. A 8 h, parallèlement à la reprise de croissance observée sur la courbe de bactéricidie, nous observons la reprise de la division bactérienne : présence de petits bacilles assez réguliers SYTO9+, persistance de quelques filaments SYTO9+ et/ou IP+ (aspect ponctué de la fluorescence); cela donne un aspect en fluorescence quasi-identique au témoin non traité. A 24 h, la multiplication a repris, et l'aspect microscopique est identique au témoin non traité. Macroscopiquement, des agrégats sont observés dans le bouillon MH, par comparaison au trouble homogène observé pour le témoin (Figure 60).

A 4x la CMI, dès 2 h, la croissance bactérienne est très ralentie : nous n'observons que peu d'éléments, de type filaments SYTO9+ ou IP+ (données non présentées). A T8 et T12, les bactéries observables sont encore peu nombreuses, de forme uniquement filamenteuse. Il est intéressant de noter que le marquage SYTO9/IP est ponctué (comme à 2x CMI, à T8), et semble indiquer l'existence de zones de condensation de l'ADN : multiplication du contenu en acides nucléiques, sans division bactérienne. A 24 h, nous avons noté une reprise de la croissance, parfaitement visible en fluorescence : observation de petits bacilles réguliers SYTO9+, comparables à ceux du témoin, mais en quantité moindre ; et de filaments ponctués SYTO9+ (marquage IP très faible).

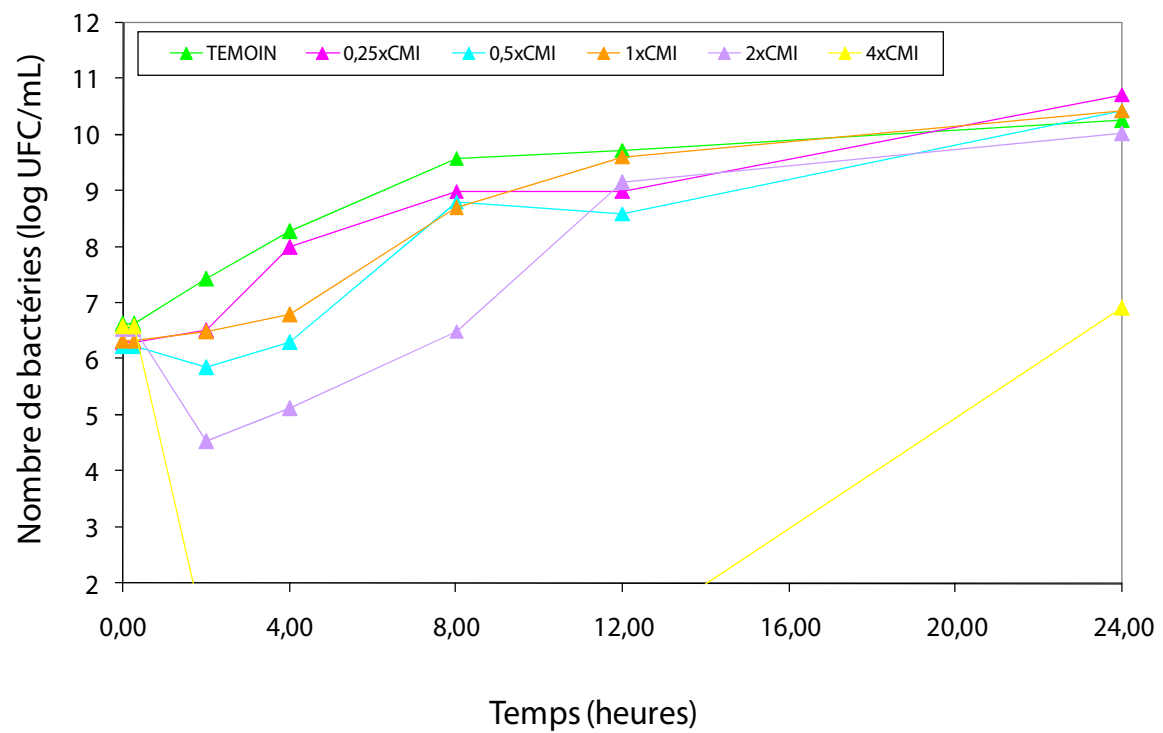


Figure 63 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur *P. aeruginosa* ATCC 27853 à 0,25x, 0,5x, 1x, 2x et 4x la CMI sur une période de 24 h (n = 4). La limite de détection est fixée à 2 log UFC/mL.



Figure 64 : Aspect macroscopique du bouillon MH après 24 h de croissance de *P. aeruginosa* ATCC 27853, en présence de 2x CMI Cx1. Présence d'agrégats difficilement dissociables par agitation.

A 8x la CMI (données non présentées), le nombre de bactéries observables étaient trop faible pour mettre en évidence un marquage SYTO9 ou IP ; cela confirme l'effet bactéricide à cette concentration.

L'effet du Cx1 semble donc bien de type bactéricide, concentration-dépendant, avec altération graduelle de la perméabilité membranaire, pouvant expliquer un ralentissement du métabolisme et de la croissance bactérienne sous la pression de sélection créée par le Cx1. L'existence d'une filamentation serait un signe supplémentaire d'une réaction de type ralentissement métabolique et d'arrêt de la division bactérienne, en réponse au stress créé par la présence du Cx1 dans le milieu environnant (nous discuterons plus loin, dans le chapitre 6 « Génération de mutants résistants », de l'éventuelle implication du système SOS dans la réponse d'*E. coli* au Cx1).

III.2. Courbes de bactéricidie de *P. aeruginosa* ATCC 27853

Les courbes de bactéricidie obtenues pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 sont assez différentes de celles obtenues pour *E. coli* ATCC 25922. Le profil obtenu montre **une activité bactéricide de type concentration-dépendante**, avec un effet maximal obtenu à 4x la CMI, concentration permettant d'obtenir **un effet bactéricide en moins de 2 h**. Pour les autres concentrations testées, alors qu'un profil identique au témoin était observé pour *E. coli*, nous notons pour *P. aeruginosa* deux phases dans les courbes :

- 1) Jusqu'à 2 h pour 0,25x la CMI, 4 h pour 0,5x et 1x la CMI, et jusqu'à 8 h pour 2x la CMI, nous avons observé un ralentissement de la croissance bactérienne par comparaison au témoin, avec un effet « bactéricide transitoire » à 2 h pour la concentration équivalente à 2x la CMI (Figure 63).
- 2) Au delà de cette période, une reprise de la croissance est observée, et à partir de 12 h, les profils de bactéricidie après exposition au Cx1 sont similaires à celui du témoin. A 2x la CMI, à 24 h, l'aspect macroscopique du bouillon MHB met en évidence l'existence d'agrégats (Figure 64), constatation similaire à celle réalisée à 12 h, à 4x la CMI pour *E. coli* ATCC 25922.

Cela souligne **l'effet concentration dépendant du Cx1** : il faut dépasser une certaine concentration pour aller au-delà d'un effet bactériostatique (ralentissement de la croissance), et obtenir un effet bactéricide. Cependant, la reprise de croissance observée à 4x la CMI à 24 h, est le témoin d'une lyse

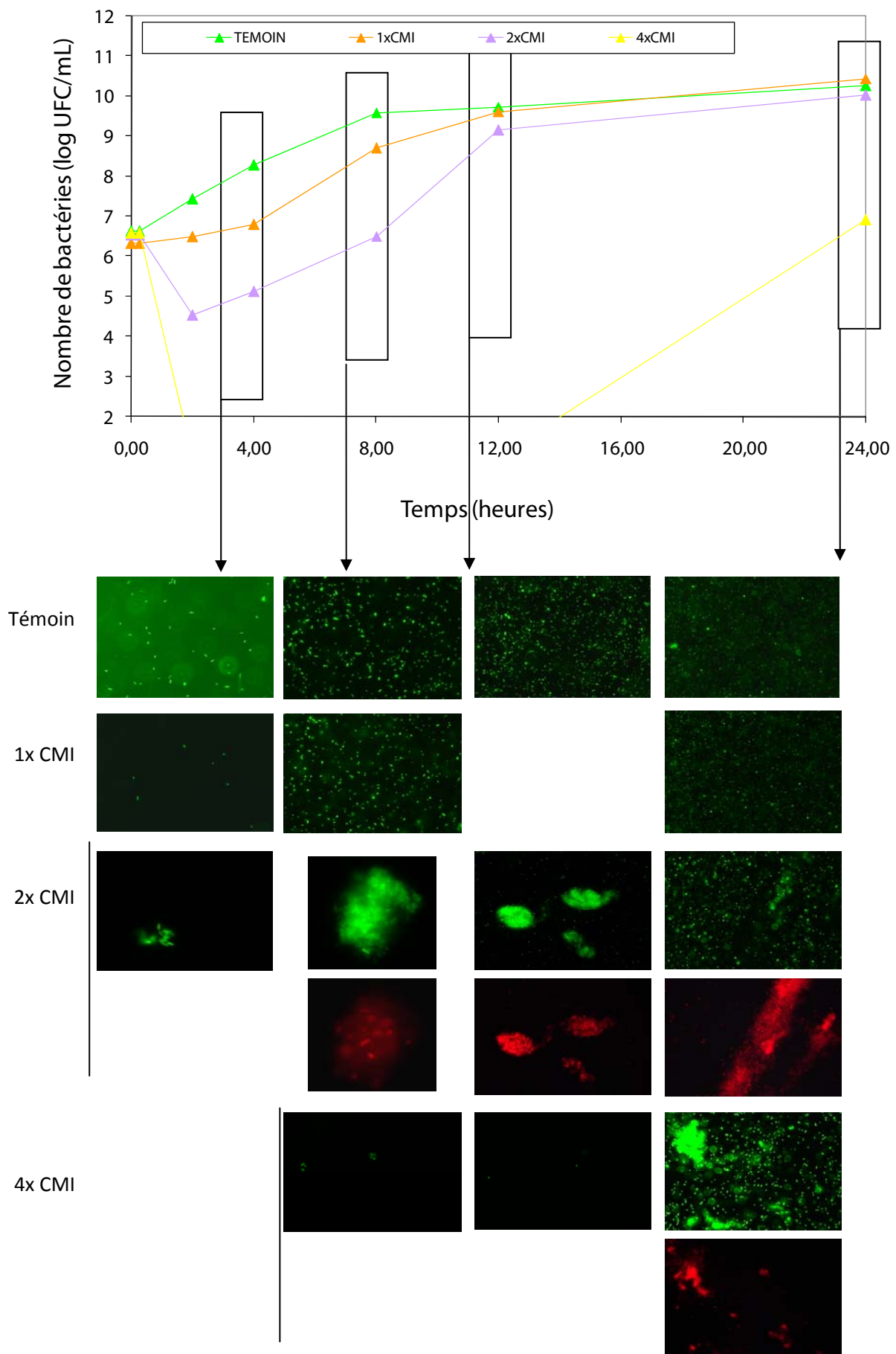


Figure 65 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur *P. aeruginosa* ATCC 27853 à 1x, 2x et 4x la CMI sur une période de 24 h (n = 4). Comparaison avec l'évolution du marquage IP/SYTO9, observation des bactéries au microscope à fluorescence.

partielle de la population bactérienne, et de l'existence de bactéries « résistantes », capables de multiplication après un certain délai.

Mais quel est l'impact du Cx1 au niveau de la perméabilité et de l'organisation membranaire ? Ces effets peuvent-ils expliquer les profils observés ? Après marquage IP/SYTO9 (Figure 65), nous avons noté l'absence de formes filamenteuses de *P. aeruginosa* ATCC 27853, quelque soit le temps d'incubation et la concentration en Cx1. Le nombre de bactéries observables par microscopie à fluorescence est plus faible que celui obtenu avec *E. coli* : très petits bacilles, SYTO9+ / IP-. Ce nombre augmente au cours du temps, avec un ralentissement notable pour 1x et 2x la CMI, comme précédemment exposé pour les courbes de bactéricidie.

A 1x la CMI, les bactéries observables sont très peu nombreuses jusqu'à T8, délai à partir duquel nous avons observé une reprise de la croissance bactérienne. A T24, l'aspect microscopique est identique à celui du témoin.

A 2x la CMI, nous n'observons que peu de bactéries jusqu'à T12, avec reprise de la croissance à T24 ; un point intéressant à noter Figure 65, est la présence d'agréats de bactéries SYTO9+, par comparaison à la répartition assez homogène observée pour les autres conditions. Cela corrobore l'observation macroscopique discutée ci-avant ; et confirme le phénomène observé avec *E. coli*. Ainsi, à partir de T8, nous avons observé des amas très importants, constitué de nombreux bacilles SYTO9+/IP+, englobés dans une sorte d'enduit formant une couche autour des bactéries (exopolysaccharides sécrétés par *P. aeruginosa* en réponse au stress créé par le Cx1 ?). A T12, la croissance reprend progressivement, avec apparition de bacilles isolés, mais persistance des amas SYTO9+/IP+ déjà observés à T8. La reprise de croissance est franche à T24, avec persistance des amas de bacilles englobés dans un enduit, mais avec un marquage uniquement par l'IP, ce qui traduit une atteinte de la perméabilité membranaire (part de la population « morte » ?).

A 4x la CMI, le nombre de bactéries observables étaient trop faible pour mettre en évidence un marquage SYTO9 ou IP ; cela confirme l'effet bactéricide à cette concentration. A T24, les bactéries restent peu nombreuses, essentiellement sous forme d'amas + enduit (même aspect que précédemment).

L'effet du Cx1 semble donc bien de type bactéricide, concentration-dépendant ; avec un effet rapide sur la perméabilité membranaire (marquage IP+ dès 4 h d'incubation).

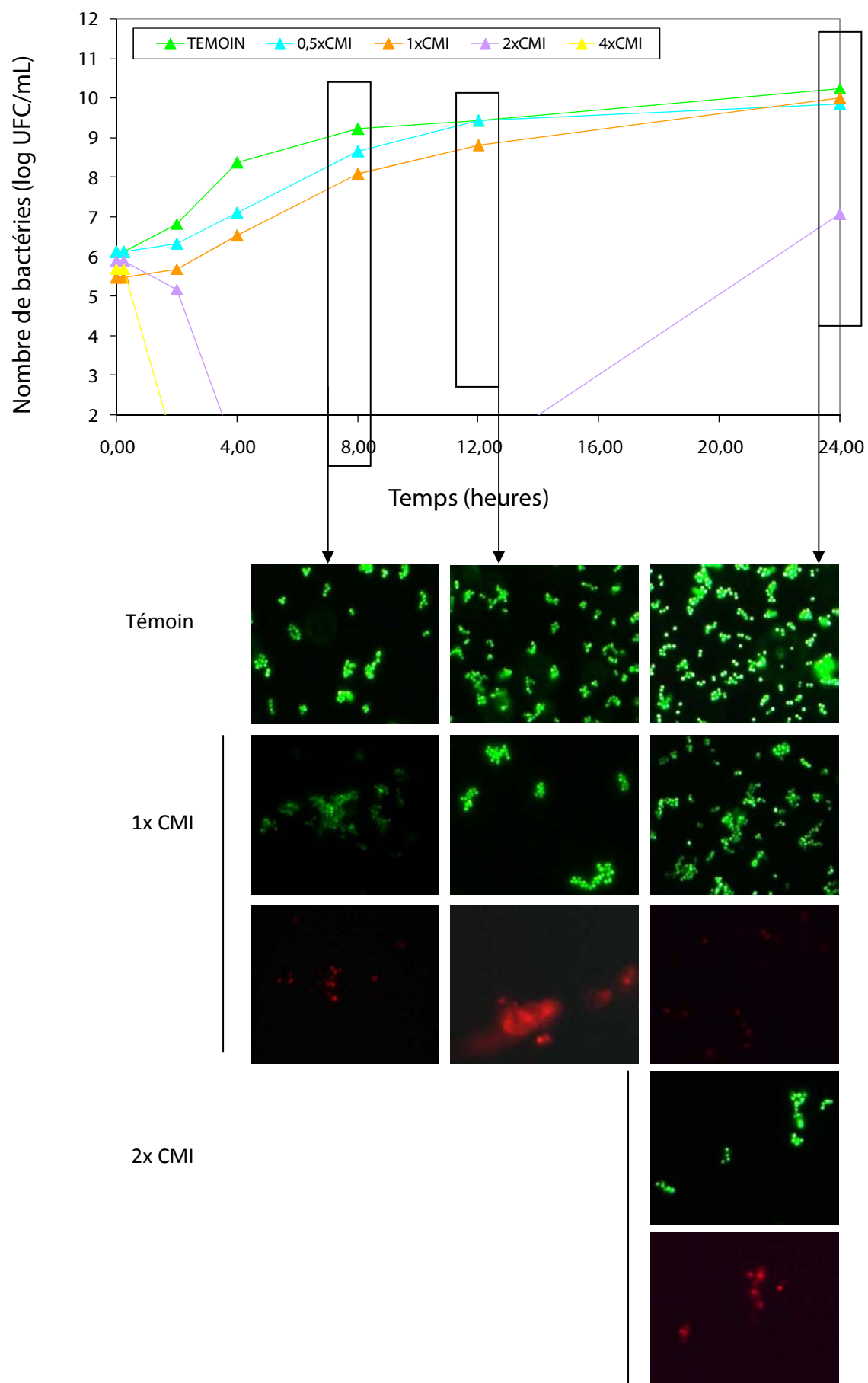


Figure 66 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur *S. aureus* ATCC 25923 à 0,5x, 1x, 2x et 4x la CMI sur une période de 24 h (n = 4). Comparaison avec l'évolution du marquage IP/SYTO9, observation des bactéries au microscope à fluorescence.

III.3. Comparaison des courbes de bactéricidie de *S. aureus* ATCC 25923 & 29213

Les courbes de bactéricidie obtenues pour *S. aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213 sont relativement semblables et montrent **une activité bactéricide de type concentration-dépendante**, avec un effet maximal obtenu à 4x la CMI, concentration permettant d'obtenir **un effet bactéricide en moins de 2 h**. Un effet bactéricide est aussi observé à 4 h à 2x la CMI pour *S. aureus* ATCC 25923; mais avec une reprise de la croissance à 24 h (Figures 66 & 67). Aucun effet n'est observé pour les concentrations correspondant à 0,5x, 1x (et 2x la CMI pour *S. aureus* ATCC 29213) : les courbes sont identiques à celle obtenue pour le témoin non traité. Les profils de bactéricidie obtenus pour ces deux souches de *S. aureus* sont assez semblables à celui observé pour *E. coli*, avec cependant un effet bactéricide à des concentrations moindres. L'effet de type « ralentissement de la croissance » noté pour *P. aeruginosa*, n'est pas observé pour ces deux souches.

La même question qu'auparavant se pose : qu'en est-il de l'évolution de la perméabilité membranaire ? Ces effets peuvent-ils être impliqués dans une modification de la vitesse de croissance bactérienne ? Seules les images obtenus pour *S. aureus* ATCC 25923 sont présentées, les images étant similaires à celles observées pour *S. aureus* ATCC 29213. Le marquage réalisé sur les bactéries témoin nous permet de mettre en évidence la croissance bactérienne, avec augmentation du nombre de bactéries observables au cours du temps, marquées par le SYTO9, mais pas (ou très peu) par l'IP. Les cocci sont réguliers, bien définis, organisés en petits amas (forme classique de la grappe de raisin) ou en courtes chaînettes (Figure 66).

A 1x la CMI, à 8 h, très peu de bactéries sont visibles au microscope à fluorescence jusqu'à T8 ; les cocci sont regroupés sous forme de gros amas, où la forme de cocci est difficile à distinguer : cocci plus ou moins gros (certains plus gros que les cocci du témoin), mal définis, SYTO9+ et IP+. Des amas semblables à ce qui a été obtenu pour *P. aeruginosa* sont observés ici, même si « l'enduit » entourant les bactéries est moindre. A 12 h, le nombre de bactéries observables augmente, mais elles sont toujours regroupées sous forme d'amas avec un marquage très intense IP+, et un marquage plus faible SYTO9+. A 24 h, comme observé sur la courbe de bactéricidie, la croissance reprend, et l'aspect est plus semblable à celui du témoin.

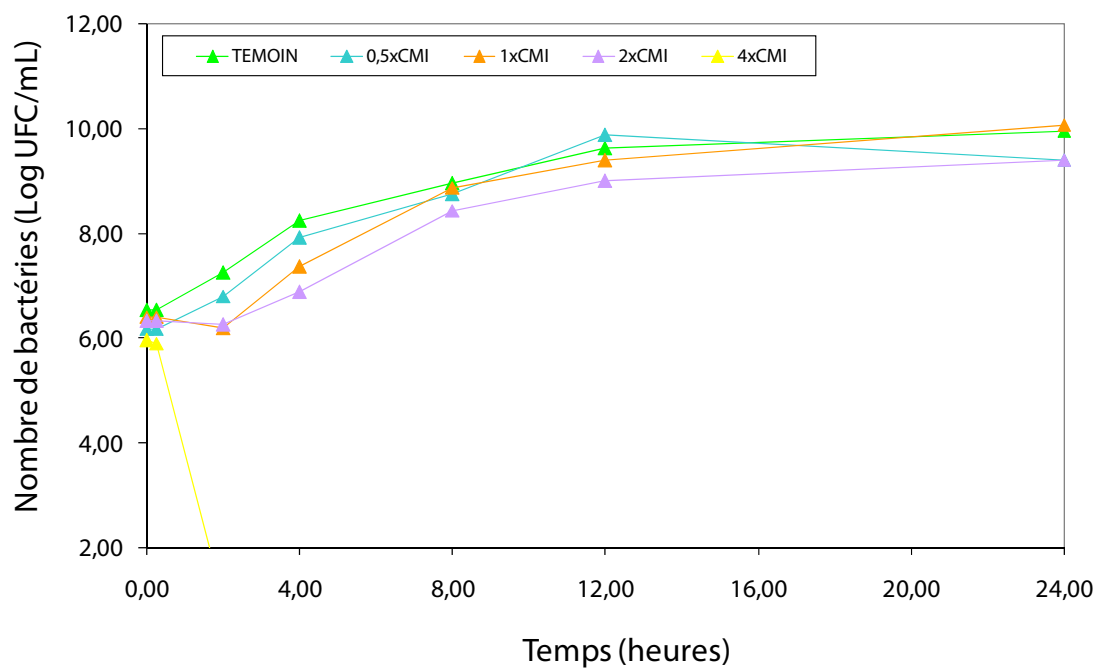


Figure 67 : Courbes de bactéricidie du Cx1 sur *S. aureus* ATCC 29213 à 0,5x, 1x, 2x et 4x la CMI sur une période de 24 h (n = 4). La limite de détection est fixée à 2 log UFC/mL.

A 2x la CMI, à 8 h, aucune bactérie n'est observable au microscope à fluorescence ; ce qui corrobore l'observation en courbe de bactéricidie : effet bactéricide à cette concentration en moins de 4 h. A 12 h, les cocci restent très peu nombreux, difficiles à observer, marqués SYTO9+ et IP+. A 24 h, la croissance a repris : les cocci sont plus nombreux, en amas, de forme mal définie, avec un marquage très intense en IP, et plus faible en SYTO9.

A 4x la CMI (données non présentées), le nombre de bactéries observables étaient trop faible pour mettre en évidence un marquage SYTO9 ou IP ; cela confirme l'effet bactéricide à cette concentration.

L'effet du Cx1 semble donc bien de type bactéricide, concentration-dépendant, avec altération graduelle de la perméabilité membranaire, pouvant expliquer un ralentissement du métabolisme et de la croissance bactérienne sous la pression de sélection créée par le Cx1.

IV. DISCUSSION

Comme expliqué précédemment dans la partie bibliographique, pour certains antibiotiques, l'activité bactéricide augmente avec la concentration d'antibiotique : ces antibiotiques sont dits concentration-dépendants, et ont généralement une vitesse de bactéricidie rapide (ex : les aminosides). Pour d'autres, l'intensité de la bactéricidie augmente avec la concentration jusqu'à un certain niveau, et est corrélée à la durée pendant laquelle cette concentration dépasse la CMI : on parle d'antibiotiques temps-dépendant (ex : β -lactamines, glycopeptides). Cette observation est à la base du mode d'administration proposé en une dose journalière pour les antibiotiques concentration-dépendants, et en doses fractionnées, voire en continu, pour les antibiotiques temps-dépendants.

Nous pouvons distinguer deux phases dans la méthode des courbes de bactéricidie :

- a) la phase précoce (les six 1^{ères} heures) permet d'observer l'influence de la concentration et du temps d'action de l'antibiotique ;
- b) la phase tardive (à la 24^{ème} heure) est influencée par d'autres paramètres (stabilité de l'antibiotique, résistance de la bactérie, hétérogénéité de la population bactérienne au départ).

Les résultats obtenus en terme de courbes de bactéricidie pour *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213, et pour *P. aeruginosa* ATCC 27853, nous permettent de conclure :

- à un effet bactéricide, de type concentration-dépendant, du Cx1, quelque soit la souche testée ;
- à l'existence de paramètres influençant l'activité « à long terme » du Cx1. L'observation de phénomènes de « re-croissance » à 24 h, pour les concentrations « sub-bactéricides » (concentrations pour lesquelles l'effet bactéricide n'est pas encore atteint, mais pour lesquelles on a dépassé l'effet bactériostatique), pourrait s'expliquer par la dégradation du Cx1, et/ou l'existence d'une hétérogénéité dans la population initiale.

Combiner la réalisation des courbes de bactéricidie, et le marquage à différents intervalles de temps, par deux fluorochromes (IP et SYTO9) permettant de déterminer l'évolution de la perméabilité membranaire, est riche d'informations. Cela permet d'approcher de plus près les mécanismes à l'origine d'un ralentissement de la croissance bactérienne ou d'un effet bactéricide. Ainsi, nous avons montré, pour *E. coli* et *S. aureus*, une atteinte graduelle de l'intégrité membranaire, fonction de la concentration en Cx1, résultats en totale concordance avec les profils obtenus pour les courbes de bactéricidie. Ainsi nous avons démontré à la fois une atteinte membranaire (marquage IP fonction du temps et de la concentration) et un retentissement métabolique (filamentation pour *E. coli* ATCC 25922), du traitement par le Cx1. Il semblerait donc qu'une des cibles du Cx1 soit pariétale, et ait un retentissement interne, impliquant le ralentissement d'un ou de plusieurs métabolismes, et l'arrêt de la division bactérienne, sans arrêt de la synthèse des acides nucléiques (persistance et augmentation de l'intensité des marquages par les deux fluorochromes). Les résultats obtenus pour *P. aeruginosa* posent question : comment peut-on expliquer l'existence de ces amas volumineux, constitués de bacilles doublement marqués par IP et SYTO9, et entourés d'une sorte d'enduit ? Peut-être pourrions nous voir dans cet aspect, la réponse de *P. aeruginosa* au stress généré par le Cx1 : sécrétion d'exopolysaccharides (équivalent du slime ?) jouant un rôle protecteur pour empêcher la fixation et/ou la pénétration du Cx1 dans les bactéries ; ou relargage de certains éléments intracellulaires, suite à l'altération de la perméabilité membranaire mise en évidence par le marquage. Cependant, l'effet du Cx1 sur *P. aeruginosa* n'est pas bactéricide à 2xCMI, et il n'est que transitoire à 4x la CMI (reprise de la croissance à T24), ce qui va plutôt dans le sens d'une altération non létale de l'intégrité membranaire.

Chapitre 5

SYNERGIE (?) avec les ANTIBIOTIQUES

I. OBJECTIFS

Du fait de la dissémination des bactéries multirésistantes, utiliser les antibiotiques en association devient indispensable, afin d'être efficace rapidement, durablement, et d'éviter la sélection de mutants résistants.

L'objectif de cette étude est de déterminer, *in vitro*, l'éventuel bénéfice de l'association du Cx1 à divers antibiotiques classiquement utilisés en routine, ayant des cibles d'action différentes. La nature de l'effet (synergique, additif, indifférent ou antagoniste) est déterminée par la technique de l'échiquier par microdilution en milieu liquide.

II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

De nombreuses méthodes ont été proposées pour l'étude de l'interaction entre molécules utilisées en association. La plupart de ces méthodes ont été développées dans les domaines de la recherche en chimiothérapie anticancéreuse, antibactérienne, antivirale [Prichard et al., 1993], ou même en enzymologie. En antibiothérapie, deux techniques sont traditionnellement utilisées pour l'évaluation de la synergie :

- la technique de l'échiquier ou « checkerboard study » ;
- la courbe de bactéricidie ou « time-kill synergy study ».

Le mécanisme exact de la synergie entre antibiotiques n'est toujours pas élucidé. Actuellement, **la seule synergie prouvée *in vivo* est celle entre les β -lactamines et les aminosides** : chacun des deux antibiotiques favorise l'action de l'autre. Ainsi, Miller et coll. ont montré l'effet précoce des β -lactamines : ils augmentent l'accumulation des aminosides à des doses sub-inhibitrices lors des 1^{ères} heures après l'administration, optimisant leur effet bactéricide [Miller et al., 1987]. Ensuite, la perméabilisation de la membrane externe par les aminosides favorise l'accumulation des β -lactamines [Hancock et al., 1981]. Les aminosides déplaceraient les ions Mg^{2+} de la membrane externe, ce qui favoriserait le passage des β -lactamines.

II.1. Définitions des termes : synergie, addition, indifférence, antagonisme

La confusion se retrouve tout d'abord au niveau des termes :

- **synergie ? potentialisation ? effet super-additif** [Gori et al., 1979] ?
- **addition** ? Ce terme a été évoqué pour la 1^{ère} fois en 1952 et défini comme l'état obtenu pour un FIC = 1 [Jawetz & Gunnison, 1952] ;
- **indifférence ? interférence** [Singer & Hitchings, 1954] ? **indépendance** [Hewlett, 1969] ? **autonomie** [King et al., 1981] ? Le terme « indifférence » a été évoqué pour la 1^{ère} fois en 1950 par Spicer [Spicer, 1950], puis défini par Jawetz en 1952 comme la situation dans laquelle deux drogues en association n'offre ni une augmentation, ni une diminution de leur activité [Jawetz & Gunnison, 1952 ; Hamilton-Miller, 1985]. La construction d'un isobogramme laisse à penser que cette interaction est plutôt « négative », et ne peut donc s'appliquer à un FIC = 1, d'où le terme addition.
- **antagonisme ? relatif ou absolu** ? [Loewe, 1953].

En 1985, Hamilton-Miller proposait les terminologies et définitions suivantes [Hamilton-Miller, 1985] :

FIC	Terminologie recommandée	Terminologie à abandonner
$\leq 0,7$	Synergie	Super-additif
$0,7 - 1,29$	Addition	Indifférence, action similaire
$\geq 1,3$	Antagonisme	Interférence, infra-additif

La définition des seuils de ces différentes catégories est aussi sujet à controverses. En théorie, une interaction est considérée comme synergique lorsque le **FIC** (Fractional Inhibitory Concentration) ou **FBC** (Fractional Bactericidal Concentration) est inférieur à 1. Cependant, par la méthode de l'échiquier, des erreurs d'une dilution peuvent survenir, et on considère généralement la synergie pour un index $\leq 0,5$. Cependant, une synergie « mineure » (0,5 à 1) peut être importante d'un point de vue clinique, comme souligné par différents auteurs [Berenbaum, 1987]. Des seuils allant de > 1 à > 4 sont utilisés pour la définition de l'antagonisme. Cependant, le seuil de > 4 est largement accepté aujourd'hui, puisqu'il permet d'éliminer l'influence des erreurs expérimentales.

Ce manque de standardisation peut causer des problèmes majeurs, dans la mesure où il est impossible de comparer les études, et donc d'analyser les résultats obtenus. Certains auteurs ont ainsi tenté de standardiser les définitions et la détermination de l'interaction entre molécules par diverses méthodes, c'est ce qui sera exposé paragraphe II.4. Malgré ces tentatives d'améliorations, les deux techniques les plus utilisées restent la technique de l'échiquier et les courbes de bactéricidie ; ainsi, les données obtenues peuvent être facilement comparées à celles présentes dans la littérature.

II.2. Technique de l'échiquier

Cette technique est simple à comprendre, facile à mettre en œuvre, mais très consommatrice en temps et en matériel. La détermination de la nature de l'interaction se fait par le calcul du FIC selon la formule suivante :

$$\text{FIC index} = X_A / \text{CMI}_A + X_B / \text{CMI}_B + \dots + X_N / \text{CMI}_N = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B + \dots + \text{FIC}_N$$

X_N : concentration de la drogue N, nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne en association

CMI_N : la CMI de la drogue seule pour la bactérie testée, en l'absence de tout autre agent

Même si cette technique met en œuvre une large gamme de concentrations, elle repose sur la détermination subjective (visuelle) d'un point critique d'inhibition de la croissance bactérienne, et ne donne aucune information quant à l'évolution de cette bactériostase ou bactéricidie dans le temps. Par ailleurs, cette technique souffre d'une faible reproductibilité. Ainsi, Rand et coll. ont évalué la reproductibilité en testant 5 souches de *P. aeruginosa* et 4 combinaisons d'antibiotiques, en répétant l'expérience 10 fois pour chaque condition. Ils ont montré que 25% des répétitions montraient des discordances [Rand et al., 1993]. Un autre inconvénient est que la détermination des FIC index est très dépendante des dilutions d'antibiotiques utilisées [Horrevorts et al., 1987]. Certains auteurs ont conclu que cette méthode était en conséquence applicable uniquement en présence de contrôles à chaque expérience, et en répétant au moins 3 fois cette détermination [Woottan et al., 1995 ; Mackay et al., 2000].

II.3. Courbes de bactéricidie

C'est la 2^{ème} technique la plus utilisée et qui a l'avantage d'apporter des informations sur l'évolution des interactions au cours du temps. Cependant, elle est tout aussi insatisfaisante, en particulier parce qu'elle ne permet d'étudier une association de molécules qu'à une concentration donnée pour chacune d'elles : d'où une nécessaire multiplication des expériences, et donc une lourdeur importante pour le manipulateur. Le rationnel sur lequel repose le choix des concentrations testées (pic, vallée, ou concentration obtenue au niveau du plateau) est souvent non expliqué et non justifié. En conséquence, il est difficile d'extrapoler les résultats à des situations cliniques dans lesquelles les concentrations sériques d'antibiotiques fluctuent au cours du temps. De plus, les seuils de définition du type d'interaction sont souvent définis de manière empirique : la synergie est généralement définie comme une réduction de plus de 2 log du nombre de UFC/mL, entre l'association et la drogue utilisée seule.

Le manque de standardisation de cette technique a été l'objet de nombreux débats :

- quelle concentration en antibiotique utiliser ?

L'utilisation de concentrations sub-inhibitrices favorise la re-croissance bactérienne pour les molécules utilisées en monothérapie, l'effet étant variable et imprévisible lorsque l'on parle d'associations. A ces concentrations, l'émergence de sous-populations résistantes est aussi envisageable.

- quel inoculum est le plus approprié ?
- quel est le temps d'incubation le plus approprié pour détecter une synergie ?

Par exemple, Glew et Pavuk ont montré une synergie à $t = 7$ h pour différentes souches d'Entérobactéries, puis une repousse à 24 h avec disparition de la synergie [Glew & Pavuk, 1984]. Cette re-croissance peut être due à des effets de concentrations, ou à l'adhésion de bactéries à la surface du tube, qui sont secondairement relarguées dans le milieu [Haag et al., 1986], ou l'inactivation des antibiotiques.

Si la technique des courbes de bactéricidie est associée à celle de l'échiquier, cela permet d'obtenir des informations cinétiques plus détaillées, tout en ne demandant pas beaucoup plus de travail. Cependant, des études ont souligné le manque de corrélation entre les deux techniques classiquement utilisées pour les tests de synergie *in vitro* [Cappelletty et al., 1996]. Les différences

observées entre les résultats obtenus par bactériostase ou bactéricidie s'expliquent tout simplement par le fait que ce sont deux phénomènes différents qui sont mesurés. Cela, combiné à l'hypothèse que le calcul des FIC et FBC index est un réel reflet de la synergie et que les antibiotiques suivent une courbe dose-réponse linéaire (ce qui est loin d'être toujours vrai), peut expliquer les divergences observées [Mackay et al., 2000]. Norden a proposé d'améliorer cette corrélation en réalisant les deux techniques le même jour [Norden, 1979].

II.4. Intérêt des tests de synergie *in vitro* ?

De nombreuses études ont évalué l'intérêt des tests de synergie *in vitro*. Les avis sont très divergents. Ainsi, dans une étude comparant l'activité *in vitro* de combinaisons d'antibiotiques dans des infections cliniques sévères à *P. aeruginosa*, les auteurs suggèrent que les données obtenues *in vitro* ne sont pas transposables à l'activité *in vivo* [Norden, 1979]. Dans une autre étude, la même année, portant sur 30 isolats de *P. aeruginosa* responsables d'endocardites, l'absence de synergie *in vitro* était prédictif d'une résistance au traitement *in vivo* [Reyes et al., 1979].

Cependant, même il n'est pas raisonnable de penser que ces tests sont aptes à prédire ce qui va se passer *in vivo* (cela dépendant de nombreux autres facteurs pharmacocinétiques et pharmacodynamiques), ils restent très utilisés. Sans standardisation, quelque soit la méthodologie, la comparaison des résultats reste hasardeuse. Cependant, ces tests, si peu standardisés soient-ils, sont utilisés depuis plus de 20 ans, et ont été d'une grande aide en pratique clinique pour guider les associations en chimiothérapie anti-infectieuse [Cappelletty et al., 1996 ; Mackay et al., 2000].

Alors que les associations d'antibiotiques sont de plus en plus fréquentes, du fait de l'émergence de bactéries multirésistantes, des recommandations seront précieuses pour la réalisation et l'interprétation de ces tests.

III. MATÉRIELS & MÉTHODES

III.1. Matériel & Réactifs

Seringue de 10, 20 ou 50 mL

Filtre 0,22 µm (filtres Millex®GP, 0,22 µm, Millipore, France)

Tubes Falcon 15 et 50 mL

Plaques de 96 puits (Greiner, 650161)

Géloses Mueller Hinton (MHA) (Difco, 225250)

Bouillons Mueller Hinton (MHB) (Difco, 275730)

Eau distillée stérile

Solution de la drogue à tester : Cx1 (M = 1221,11 g/mol) fournie par le Pr. Regnoul de Vains sous forme de poudre blanche, reprise en eau distillée stérile et filtrée sur 0,22 µm pour obtenir une solution stérile à 10^{-2} mol/L. Nous nous sommes procuré les antibiotiques commerciaux par les fabricants, sous forme de poudre stérile, prête à l'emploi.

III.2. Souches bactériennes étudiées

Trois souches de référence ont été utilisées, correspondant à celles étudiées pour les CMI et les CMB : *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (du fait de la lourdeur de ces manipulations, il a été décidé de n'étudier qu'une seule souche de référence pour *S. aureus*). Pour chacune de ces souches ont été choisis 3 isolats cliniques correspondant, présentant divers profils de résistance aux antibiotiques classiquement utilisés en routine : EcR1, EcR2, EcR3 / SaR1, SaR3, SaR4 / PaR2, PaR3, PaR5. Les profils de sensibilité aux antibiotiques de ces isolats cliniques sont figurés Annexe 1.

III.3. Mode opératoire : Technique de l'échiquier

J-1 : Mise en culture des bactéries sur gélose MH

Incuber 24 h à 35°C.

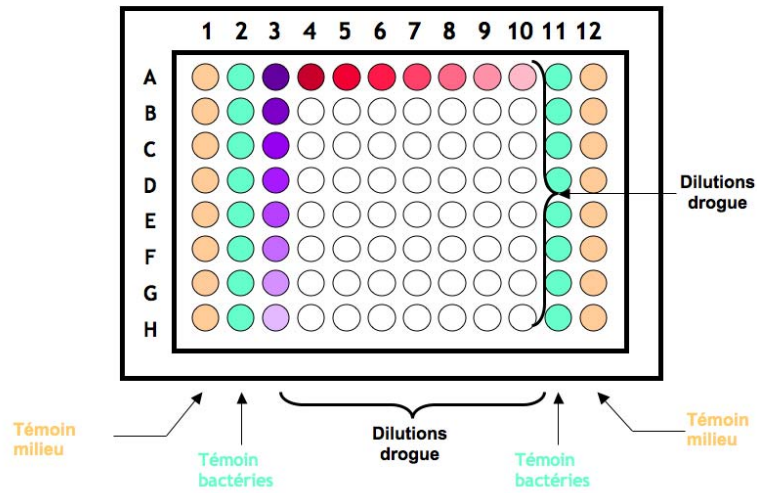


Figure 68 : Schéma de la plaque obtenue lors de la réalisation du test de synergie par la technique de l'échiquier.

J0 : Ensemencement d'un bouillon MH

Prélever une colonie « moyenne » sur la gélose J-1 et ensemencer 5 mL de bouillon MH.

Incuber 24 h à 35°C.

J1 : Préparation des plaques de 96 puits

➤ Préparation de l'inoculum bactérien

La pureté des souches est vérifiée par l'absence de contaminants sur la gélose MH ensemencée parallèlement au bouillon, et par réalisation d'une coloration de Gram.

La suspension bactérienne est transférée dans un tube Falcon de 15 mL, centrifugée 10 min à 4500 g puis le culot est remis en suspension dans 1 mL d'eau distillée stérile. Les dilutions adéquates sont ensuite réalisées afin d'obtenir un inoculum bactérien entre 5.10^5 et 5.10^6 UFC/mL.

➤ Préparer les solutions : 1) ATB à tester, 2) Cx1

Les CMI des antibiotiques ont été déterminées préalablement pour chaque souche, par méthode de microdilution en milieu liquide [CLSI, 2003].

Les dilutions adéquates sont réalisées afin d'obtenir une solution de concentration équivalente à 32 fois la CMI de l'ATB à tester, en milieu MH. Puis nous avons procédé à une série de dilutions d'ordre 2 en milieu MH afin d'obtenir les concentrations suivantes : 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 et 0,25 fois la CMI (tubes Falcon de 15 mL). Le même mode opératoire est suivi pour le Cx1. Cela permet d'obtenir une gamme de concentration de 8 à 0,06 fois la CMI dans la microplaque pour les deux molécules (dilution au demi avec addition de la 2^{ème} molécule, puis nouvelle dilution au 1/2 après ajout de la suspension bactérienne). On obtient ainsi 64 combinaisons ATB/Cx1.

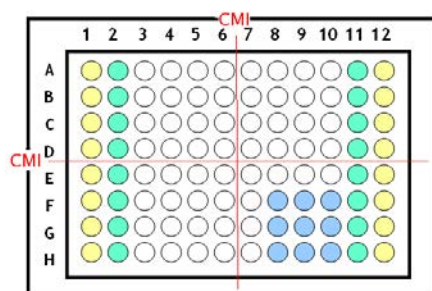
Pour chaque plaque, 1 mL de solution de chaque dilution est nécessaire.

➤ Préparation des microplaques (Schéma de plaque, Figure 68)

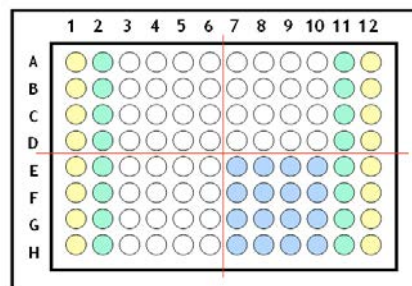
Le volume final contenu dans chacun des puits doit être de 100 µL. Deux témoins doivent être présents sur chaque plaque :

- colonne 1 et 12 : témoin milieu
- colonne 2 et 11 : témoin milieu + bactéries

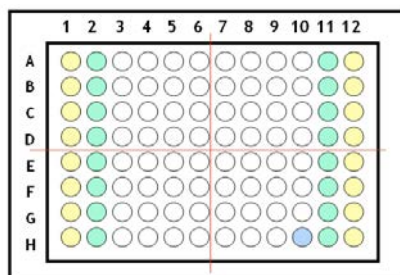
Additivité



Indifférence



Synergie



Antagonisme

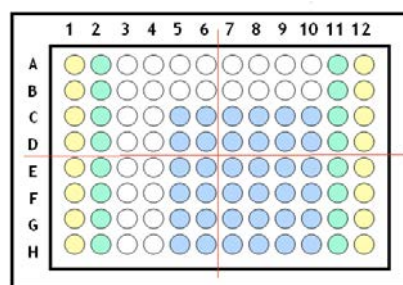


Figure 69 : Schéma des différents profils obtenus : synergie, addition, indifférence, antagonisme.

- *Distribution du milieu MH*

100 µL dans chacun des puits des colonnes 1 et 12.

50 µL dans chacun des puits des colonnes 2 et 11.

- *Distribution de la gamme de dilution de l'ATB à tester et de la molécule d'intérêt*

Cx1 : 25 µL dans les puits des colonnes 11 à 3, en commençant par la plus faible concentration.

ATB : 25 µL dans les puits des lignes H à A (colonnes 3 à 11), en commençant par la plus faible concentration.

- *Distribution de la suspension bactérienne*

50 µL dans chacun des puits des colonnes 2 à 11.

J2 : Lecture de la turbidité à 540 nm.

Les différents types d'interactions observées par la technique de l'échiquier sont présentées Figure 69. Détermination du Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC) :

$\text{FIC} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \frac{\text{CMI}_A \text{ en assoc}}{\text{CMI}_A \text{ seul}} + \frac{\text{CMI}_B \text{ en assoc}}{\text{CMI}_B \text{ seul}}$
--

$\text{FIC} \leq 0,5$: effet synergique

$0,5 < \text{FIC} \leq 1$: effet additif

$1 < \text{FIC} \leq 4$: effet indifférent

> 4 : effet antagoniste

Pour chaque souche et chaque combinaison antibiotique/Cx1, les expériences ont été répétées au minimum 3 fois.

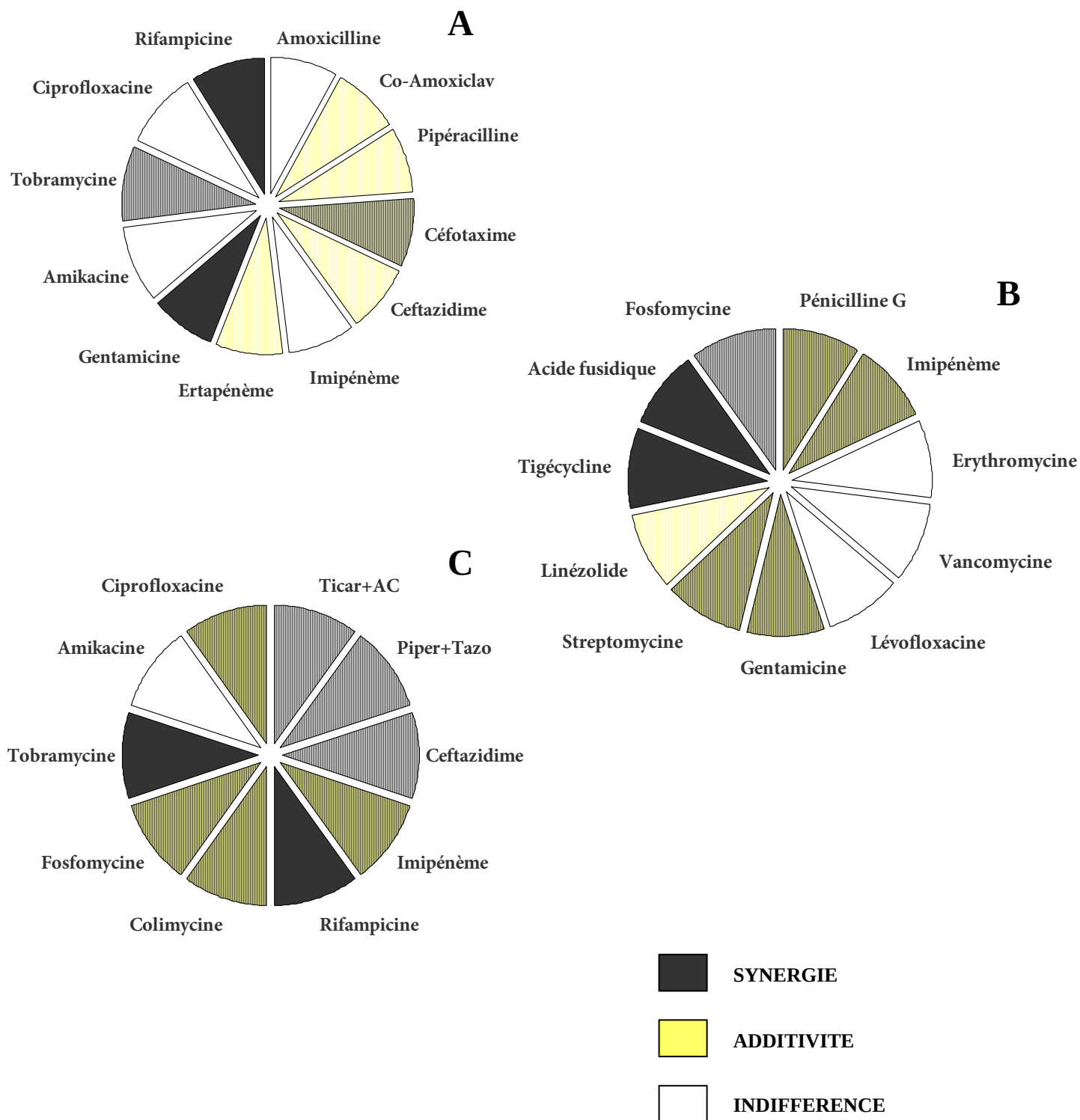


Figure 70 : Représentation schématique des interactions obtenues selon les genres bactériens (4 souches/genre). A : *E. coli* ; B : *S. aureus* ; C : *P. aeruginosa*.

IV. RÉSULTATS & DISCUSSION

Les résultats obtenus vous sont présentés de deux façons :

- sous forme de graphiques par secteurs pour résumer les types d'interactions obtenues pour les 4 souches d'un genre bactérien (Figure 70) ;
- sous forme de tableaux, présentant de façon plus détaillée, par couple ATB/Cx1 : FIC index obtenus lors des différentes expériences, concentrations optimales pour la synergie, CMI des composés utilisés seuls, gammes évaluées et nature de l'interaction observée (Tableaux II à XIII).

Tableau II : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour *Escherichia coli* ATCC 25922 (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922					
Cx1/Amoxicilline	1-4	nd	4/4	32/32	Indifférence
Cx1/Amoxicilline-Acide clavulanique	0,53-1	0,125/2	4/4	16/256	Additivité
Cx1/Pipéracilline	1-4	nd	4/2	16/256	Indifférence
Cx1/Céfotaxime	0,53/1	0,125/0,03	4/0,06	16/1	Additivité
Cx1/Ceftazidime	0,62-0,98	2/0,015	4/0,125	16/1	Additivité
Cx1/Imipénème	1-4	nd	4/0,125	16/1	Indifférence
Cx1/Ertapénème	0,625/1	1/0,07	4/0,015	16/1	Additivité
Cx1/Gentamicine	0,27-0,98	0,125/0,03	4/0,125	16/4	Synergie
Cx1/Amikacine	1-4	nd	4/0,25	16/4	Indifférence
Cx1/Tobramycine	0,365-1	0,5/0,06	4/0,25	16/4	Synergie
Cx1/Ciprofloxacin	1-4	nd	2/0,015	16/1	Indifférence
Cx1/Rifampicine	0,16-1	0,5/0,125	4/4	16/16	Synergie

Tableau III : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour EcR1 (Pénicilline acquise) (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
EcR1					
Cx1/Amoxicilline	1-4	nd	2/>256	32/256	Indifférence
Cx1/Amoxicilline-Acide clavulanique	1-4	nd	2/16	16/256	Indifférence
Cx1/Pipéracilline	1-4	nd	2/256	16/256	Indifférence
Cx1/Céfotaxime	0,75-1	1/0,015	2/0,06	16/1	Additivité
Cx1/Ceftazidime	0,56-1	0,125/0,125	2/0,25	16/1	Additivité
Cx1/Imipénème	1-4	nd	2/0,125	16/1	Indifférence
Cx1/Ertapénème	0,75-1	0,5/0,07	2/0,015	16/1	Additivité
Cx1/Gentamicine	0,3/1	0,125/0,03	2/0,125	16/4	Synergie
Cx1/Amikacine	1-4	nd	2/0,25	16/4	Indifférence
Cx1/Tobramycine	1-4	nd	2/0,25	16/4	Indifférence
Cx1/Ciprofloxacine	1-4	nd	2/0,015	16/1	Indifférence
Cx1/Rifampicine	0,28-1	0,5/0,125	2/4	16/16	Synergie

Tableau IV : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour EcR2 (Céphalosporinase hyperproduite) (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
EcR2					
Cx1/Amoxicilline	1-4	nd	2/256	16/256	Indifférence
Cx1/Amoxicilline-Acide clavulanique	0,56-1	0,125/128	2/256	32/256	Additivité
Cx1/Pipéracilline	0,56-1	0,125/16	2/32	16/256	Additivité
Cx1/Céfotaxime	1-4	nd	2/4	16/32	Indifférence
Cx1/Ceftazidime	1-4	nd	2/8	16/32	Indifférence
Cx1/Imipénème	1-4	nd	2/0,125	16/1	Indifférence
Cx1/Ertapénème	1-4	nd	2/0,03	16/1	Indifférence
Cx1/Gentamicine	0,31-1	0,125/0,5	2/2	16/4	Synergie
Cx1/Amikacine	1-4	nd	2/0,5	16/4	Indifférence
Cx1/Tobramycine	1-4	nd	2/4	16/4	Indifférence
Cx1/Ciprofloxacine	1-4	nd	2/0,125	16/1	Indifférence
Cx1/Rifampicine	0,31-1	0,25/0,5	2/2	16/16	Synergie

Tableau V : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour EcR3 (BLSE) (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
EcR3					
Cx1/Amoxicilline	1-4	nd	2/>256	16/256	Indifférence
Cx1/Amoxicilline-Acide clavulanique	0,56-1	0,125/16	2/32	16/256	Additivité
Cx1/Pipéracilline	1-4	nd	2/128	16/256	Indifférence
Cx1/Céfotaxime	0,375-1	0,25/32	2/128	16/256	Synergie
Cx1/Ceftazidime	0,56-1	0,125/0,5	2/1	16/16	Additivité
Cx1/Imipénème	1-4	nd	2/0,125	16/1	Indifférence
Cx1/Ertapénème	1-4	nd	2/0,0015	16/1	Indifférence
Cx1/Gentamicine	0,31/1	0,125/0,5	2/2	16/4	Synergie
Cx1/Amikacine	1-4	nd	2/1	16/4	Indifférence
Cx1/Tobramycine	1-4	nd	2/4	16/4	Indifférence
Cx1/Ciprofloxacine	0,56/1	0,125/0,03	2/0,06	16/1	Additivité
Cx1/Rifampicine	0,25-1	0,25/0,5	2/4	16/16	Synergie

Tableau VI : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)		CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
Staphylococcus aureus ATCC 29213						
Cx1/Pénicilline G		0,5-1	2/0,25	8/1	64/4	Additivité
Cx1/Imipénème		1-4	nd	8/0,015	64/1	Indifférence
Cx1/Erythromycine		1-4	nd	8/0,5	64/4	Indifférence
Cx1/Vancomycine		0,75-1	4/0,125	8/0,5	64/4	Additivité
Cx1/Lévofloxacine		1-4	nd	8/0,125	64/4	Indifférence
Cx1/Amikacine		0,53-1	4/0,03	8/1	64/4	Additivité
Cx1/Gentamicine		0,49-1	2/0,06	8/0,25	64/2	Additivité
Cx1/Streptomycine		0,375-1	1/1	8/4	64/32	Synergie
Cx1/Linézolide		1-4	nd	8/2	64/8	Indifférence
Cx1/Tigécycline		0,18-1	0,5/0,03	8/0,25	64/2	Synergie
Cx1/Acide fusidique		0,125-1	0,5/0,125	8/2	64/8	Synergie
Cx1/Fosfomycine		0,18-1	0,5/1	8/8	64/32	Synergie

Tableau VII : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour SaR1 (SARM, pas de résistances associées) (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
SaR1					
Cx1/Pénicilline G	0,5-1	2/0,125	8/0,5	64/4	Additivité
Cx1/Imipénème	0,625-1	0,5/0,06	8/0,25	64/4	Additivité
Cx1/Erythromycine	1-4	nd	8/0,5	64/4	Indifférence
Cx1/Vancomycine	1-4	nd	8/0,25	64/4	Indifférence
Cx1/Lévofoxacine	1-4	nd	8/0,25	64/4	Indifférence
Cx1/Gentamicine	0,49-1	2/0,06	8/0,25	64/2	Additivité
Cx1/Streptomycine	0,75-1	4/1	8/4	64/32	Additivité
Cx1/Linézolide	1-4	nd	8/2	64/8	Indifférence
Cx1/Tigécycline	0,18-1	0,5/0,03	8/0,25	64/2	Synergie
Cx1/Acide fusidique	0,245-1	1/0,06	8/0,5	64/8	Synergie
Cx1/Fosfomycine	0,31-1	0,5/0,5	8/2	64/32	Synergie

Tableau VIII : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour SaR3 (SARM, KT R, Ofloxacin R) (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
SaR3					
Cx1/Pénicilline G	0,375-1	2/0,06	8/0,5	64/4	Synergie
Cx1/Imipénème	0,56-1	2/0,06	8/0,25	64/4	Additivité
Cx1/Erythromycine	1-4	nd	8/0,5	64/4	Indifférence
Cx1/Vancomycine	1-4	nd	8/0,25	64/4	Indifférence
Cx1/Lévofoxacin	1-4	nd	8/8	64/32	Indifférence
Cx1/Gentamicine	0,74-1	4/0,03	8/0,125	64/2	Additivité
Cx1/Streptomycine	0,625-1	1/2	8/4	64/32	Additivité
Cx1/Linézolid	1-4	nd	8/2	64/8	Indifférence
Cx1/Tigécycline	0,245-1	1/0,03	8/0,25	64/2	Synergie
Cx1/Acide fusidique	0,365-1	1/0,06	8/0,25	64/8	Synergie
Cx1/Fosfomycine	0,18-1	0,5/2	8/16	64/32	Synergie

Tableau IX : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour SaR4 (SARM, KT R, MLS_B constitutif, Ofloxacin R) (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
SaR4					
Cx1/Pénicilline G	0,375-1	2/0,5	8/4	64/32	Synergie
Cx1/Imipénème	0,375-1	1/0,5 2/0,25	8/2	64/32	Synergie
Cx1/Erythromycine	1-4	nd	8/>32	64/32	Indifférence
Cx1/Vancomycine	1-4	nd	8/0,25	64/4	Indifférence
Cx1/Lévofoxacin	1-4	nd	8/>32	64/32	Indifférence
Cx1/Gentamicine	0,30-1	0,5/0,06	8/0,25	64/2	Synergie
Cx1/Streptomycine	0,625-1	4/0,4	8/4	64/32	Additivité
Cx1/Linézolid	0,56-1	0,5/1	8/2	64/8	Additivité
Cx1/Tigécycline	0,18-1	0,5/0,03	8/0,25	64/2	Synergie
Cx1/Acide fusidique	0,08-1	0,5/0,06	8/4	64/8	Synergie
Cx1/Fosfomycine	1-4	nd	8/128	64/32	Indifférence

Tableau X : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853					
Cx1/Ticarcilline-Acide clavulanique	0,375-1	4/1	32/8	256/32	Synergie
Cx1/Pipéracilline-Tazobactam	0,31-1	2/4	32/16	256/128	Synergie
Cx1/Ceftazidime	0,375-1	4/1	32/4	256/64	Synergie
Cx1/Imipénème	0,5-4	8/0,5	32/2	256/16	Additivité
Cx1/Rifampicine	0,12-1	2/4	32/64	256/256	Synergie
Cx1/Colimycine	0,5-1	nd	32/4	256/64	Additivité
Cx1/Fosfomycine	0,375-1	4/4 ou 2/8	32/16	256/256	Synergie
Cx1/Tobramycine	0,18-1	2/0,06	32/0,5	256/4	Synergie
Cx1/Amikacine	1-4	nd	32/0,5	256/4	Indifférence
Cx1/Ciprofloxacine	0,185-1	4/0,125	32/0,5	256/4	Synergie

Tableau XI : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour PaR2 (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
PaR2					
Cx1/Ticarcilline-Acide clavulanique	1-4	nd	32/512	256/512	Indifférence
Cx1/Pipéracilline-Tazobactam	0,25-1	4/64	32/512	256/512	Synergie
Cx1/Ceftazidime	1-4	nd	32/8	256/64	Indifférence
Cx1/Imipénème	0,5-4	8/1	32/2	256/16	Additivité
Cx1/Rifampicine	0,185-1	4/4 ou 8/2	32/64	256/256	Synergie
Cx1/Colimycine	1-4	nd	32/8	256/64	Indifférence
Cx1/Fosfomycine	0,5-4	16/32	32/64	256/256	Additivité
Cx1/Tobramycine	0,31-1	2/0,25	32/1	256/4	Synergie
Cx1/Amikacine	1-4	nd	32/1	256/4	Indifférence
Cx1/Ciprofloxacine	0,5-4	nd	32/1	256/4	Additivité

Tableau XII : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour PaR3 (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
PaR3					
Cx1/Ticarcilline-Acide clavulanique	1-4	nd	32/512	256/512	Indifférence
Cx1/Pipéracilline-Tazobactam	1-4	nd	32/512	256/512	Indifférence
Cx1/Ceftazidime	0,31-1	2/4	32/16	256/64	Synergie
Cx1/Imipénème	0,5-1	8/8	32/32	256/256	Additivité
Cx1/Rifampicine	0,09-1	2/2	32/32	256/256	Synergie
Cx1/Colimycine	0,155-1	4/0,5	32/8	256/64	Synergie
Cx1/Fosfomycine	0,31-1	2/64	32/> 64	256/256	Synergie
Cx1/Tobramycine	0,185-1	2/8	32/64	256/256	Synergie
Cx1/Amikacine	1-4	nd	32/1	256/4	Indifférence
Cx1/Ciprofloxacine	0,5/4	8/0,125	32/0,5	256/4	Additivité

Tableau XIII : FIC index et concentrations optimales Cx1/ATB, valeurs obtenues pour PaR5 (n=4).

Associations	FIC index	Concentrations optimales (mg/L)	CMI (mg/L)	Gammes testées (mg/L)	Conclusion
PaR5					
Cx1/Ticarcilline-Acide clavulanique	1-4	nd	32/32	256/512	Indifférence
Cx1/Pipéracilline-Tazobactam	0,31-1	2/8	32/32	256/512	Synergie
Cx1/Ceftazidime	1-4	nd	32/8	256/64	Indifférence
Cx1/Imipénème	0,25-1	4/0,25	32/2	256/16	Synergie
Cx1/Rifampicine	0,185-1	2/2	32/16	256/256	Synergie
Cx1/Colimycine	0,187-1	2/2	32/16	256/64	Synergie
Cx1/Fosfomycine	0,375-1	8/2 ou 4/4	32/16	256/256	Synergie
Cx1/Tobramycine	0,25-1	4/0,125	32/1	256/4	Synergie
Cx1/Amikacine	1-4	nd	32/0,5	256/4	Indifférence
Cx1/Ciprofloxacine	0,31-1	2/0,25	32/1	256/4	Synergie

Tout d'abord, **trois observations intéressantes** peuvent être faites :

- **aucun antagonisme n'a été observé**, quelque soit la souche et les associations testées ;
- ***P. aeruginosa* est la souche pour laquelle nous avons obtenu le plus grand nombre d'associations synergiques**, avec des antibiotiques très variés (β -lactamines, aminosides, fluoroquinolones...) ;
- une **restauration de l'activité de certains antibiotiques** est observée pour tous les isolats cliniques testés.

Par ailleurs, les antibiotiques pour lesquels nous avons obtenu une synergie agissent au niveau :

- **de la paroi** : fosfomycine (sachant que le mécanisme d'action spécifique de la fosfomycine se traduit par une synergie d'action quasi-constante avec les autres antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne) mais aussi avec les associations pipéracilline-tazobactam & ticarcilline-acide clavulanique, et la ceftazidime ;
- **de la synthèse des protéines** : tigécycline, gentamicine, tobramycine, streptomycine, acide fusidique ;
- **de la synthèse des acides nucléiques** : rifampicine, ciprofloxacine.

Comment le Cx1 peut-il agir en synergie avec ces antibiotiques ?

L'hypothèse la plus probable reste la déstabilisation de la paroi bactérienne. Ainsi, le Cx1 permettrait, une pénétration plus facile de ces molécules, favorisant l'accès des antibiotiques à leur cible intracellulaire. Le Cx1, composé polycationique pourrait favoriser l'entrée :

- (i) en déstabilisant la paroi par un jeu d'interactions électrostatiques, un peu comme un détergent cationique, ou la chlorhexidine.
- (ii) en activant ou en favorisant certains mécanismes de transport actif tels que les porines ou d'autres systèmes de transport liés à la chaîne respiratoire... Par activation de certaines voies de transmission du signal ?
- (iii) par fixation de façon aspécifique sur la membrane, assemblage et formation de canaux, un peu comme ce qui est observé avec certains peptides cationiques...

Chapitre 6

GENERATION de MUTANTS RESISTANTS

I. OBJECTIFS

Les nouveaux agents antibactériens sont invariablement évalués pour le potentiel de sélection de mutants résistants et leur fréquence d'apparition *in vitro*. Cela apporte des informations indispensables sur la rapidité d'apparition des résistances, *in vivo*, que ce soit au cours d'une antibiothérapie ou dans l'environnement [O'Neill & Chopra, 2001]. De plus, les mutants obtenus au cours de telles expérimentations peuvent être importants en vue de l'identification du mécanisme d'action de ces nouveaux agents [Stabb et al., 1998 ; Margolis et al., 2000], mais aussi pour prédire les mécanismes de résistance qui peuvent survenir lors de leur usage en chimiothérapie anti-infectieuse. De telles évaluations sont indispensables avant le passage en phase clinique, et certains auteurs recommandent même la détermination du potentiel de sélection de mutants résistants sur des souches hypermutatrices [O'Neill & Chopra, 2001].

L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel du Cx1 à générer des mutants *in vitro*, à quelle dose, dans quel délai et sur quelles espèces bactériennes.

II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

II.1. Généralités sur les mutations et l'émergence de mutants résistants aux ATB

Les mutations peuvent survenir :

- (i) dans les gènes de structure des cibles des antibiotiques,
- (ii) dans des gènes de régulation ou encore,
- (iii) dans des régions modulant l'expression de gènes de résistance. Généralement, une mutation ne confère la résistance que vis-à-vis d'un antibiotique ou de plusieurs molécules appartenant à la même classe. Il s'agit le plus souvent de la streptomycine, la rifampicine, l'acide fusidique, la fosfomycine et les quinolones ; mais d'autres antibiotiques peuvent être touchés.

Exemples :

- (1) la mutation Ser351Leu dans RpoB (sous-unité β de l'ARN polymérase) est à l'origine d'une résistance à la rifampicine chez *M. tuberculosis*.

- (2) La combinaison de la mutation Met485Ala et de l'insertion d'une sérine en position 466 est associée à une résistance à haut niveau aux β -lactamines chez *E. faecium*.
- (3) La mutation A2058G dans l'ARN ribosomal 23S entraîne la résistance aux MLS_B chez *H. pylori* et *Propionibacterium* spp.

Certaines bactéries peuvent devenir « **hypermutatrices** » par inactivation de systèmes qui normalement corrigent les erreurs de réplication (mutations dans les gènes *mut*) ou par induction du système SOS (lui-même pouvant être induit par des antibiotiques comme les quinolones) entraînant la synthèse de polymérases qui fonctionnent avec une moins grande fiabilité. Livermore a ainsi montré que 36 % des patients atteints de mucoviscidose étaient affectés par des souches multirésistantes de *P. aeruginosa* hypermutatrices, contrairement au groupe témoin où aucune souche semblable n'a été retrouvée [Livermore, 2003]. Par ailleurs, Cirz et al. ont montré que prévenir l'induction du système SOS rendait impossible la sélection *in vivo* de souches d'*E. coli* résistantes à la rifampicine et à la ciprofloxacine [Cirz et al., 2005].

Certaines mutations affectent la perméabilité et/ou l'efflux et peuvent alors conférer une résistance à des antibiotiques multiples non reliés structurellement. Ce type de mutation a souvent des effets en cascade. C'est le cas chez *E. coli* où une mutation dans le régulon *mar* affecte simultanément l'expression de plus de soixante gènes réduisant la production de la **porine OmpF** et augmentant celle de **AcrAB**, une pompe assurant l'efflux des β -lactamines, des fluoroquinolones, du chloramphénicol, de la tétracycline, et de certains colorants et détergents. Un autre exemple concerne la résistance de *P. aeruginosa* à l'imipénème : elle résulte le plus souvent d'une mutation entraînant la baisse de production de la **porine OprD2**.

Enfin, certaines mutations altèrent la structure du site actif d'enzymes, élargissant ainsi leur spectre de substrats. Les exemples les plus connus sont les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui résultent de mutations ponctuelles dans les gènes de β -lactamases de type TEM, SHV, ou CTX-M.

II.2. Sélection de mutants résistants *in vitro*

La fréquence des mutations conduisant à la résistance aux antibiotiques, et le coût que cela représente au niveau du « fitness » de la bactérie sont des paramètres clés qui déterminent l'émergence et la survie des mutants résistants au sein des populations bactériennes [Nilsson et al.,

2003 ; Andersson, 2006 ; Vickers et al., 2007]. Ces paramètres peuvent être estimés par les tests de mutation *in vitro*, et peuvent prédire comment peut survenir la résistance et comment elle peut se maintenir lors d'une chimiothérapie anti-infectieuse.

La sélection de bactéries résistantes, sous la pression de sélection des antibiotiques, résulte généralement de la croissance de bactéries spontanément résistantes avant tout traitement [Ferran et al., 2007]. Quand l'inoculum bactérien au site de l'infection est supérieur à 10^9 - 10^{10} UFC/mL, il est exact de s'attendre, avec une fréquence de mutation spontanée d'environ 10^{-9} - 10^{-7} , à ce qu'avant tout contact avec un antibiotique, une petite sous-population de mutants résistants co-existe avec une population beaucoup plus large de bactéries sensibles. La CMI permet d'estimer la susceptibilité de la population bactérienne prédominante, alors que **la Concentration de Prévention des Mutations (CPM)** autorise une estimation de la sensibilité de la petite sous-population résistante. La CMI et la CPM définissent les bornes de la « **fenêtre de sélection des mutants** », une échelle de concentration d'antibiotiques favorisant la sélection de ces mutants spontanément résistants [Zhao & Drlica, 2001 ; Firsov et al., 2003 ; Zinner et al., 2003].

L'influence de l'inoculum bactérien a déjà été montré, que ce soit sur la valeur de la CMI ou sur l'émergence de mutants résistants [Ferran et al., 2007 ; Quinn et al., 2007]. Ainsi, il a été démontré que même si la taille de l'inoculum n'influence pas l'effet bactéricide initial de la marbofloxacin sur *E. coli* ATCC 25922, une apparition systématique de mutants spontanément résistants était obtenue avec un inoculum de 10^9 UFC/mL, alors que les mutants n'étaient observés que dans 1/3 cas pour les inoculum 10^5 et 10^7 UFC/mL [Ferran et al., 2007]. Cet effet inoculum a été confirmé pour d'autres antibiotiques (vancomycine, daptomycine, autres fluoroquinolones), et d'autres souches (*S. aureus*) [Firsov et al., 2006 ; Quinn et al., 2007].

III. MATÉRIELS & MÉTHODES

III.1. Matériel & Réactifs

Seringue de 10, 20 ou 50 mL

Filtre 0,22 µm (filtres Millex®GP, 0,22 µm, Millipore, France)

Tubes Falcon 15 et 50 mL

Tubes en verre stériles, à bouchon à vis

Plaques 96 puits à fonds U (Greiner)

Géloses Mueller Hinton (Difco, 225250)

Bouillons Mueller Hinton (Difco, 275730)

Eau distillée

Solution de la drogue à tester : Cx1 (M = 1221,11 g/mol) fournie par le Pr. Regnouf de Vains sous forme de poudre blanche, reprise en eau distillée stérile et filtrée sur 0,22 µm pour obtenir une solution stérile à 10^{-2} mol/L. Une nouvelle solution est préparée au minimum chaque semaine, et conservée à +4°C.

III.2. Souches bactériennes étudiées

Trois souches de référence ont été utilisées, correspondant à celles étudiées pour les CMI et les CMB : *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853. La génération de mutants résistants est évaluée pour un inoculum d'environ 10^6 UFC/mL pour les 3 souches, et l'effet d'un inoculum plus fort (10^9 UFC/mL) a été évalué pour *E. coli* ATCC 25922.

III. 3. Mode opératoire : sélection de mutants par passages successifs *in vitro*

J-1 : Mise en culture des bactéries sur gélose MH

Incuber 24 h à 35°C.

J0 : Ensemencement d'un bouillon MH

Prélever une colonie « moyenne » sur la gélose J-1 et ensemercer 5 mL de bouillon MH.

Incuber 24 h à 35°C.

J1 : Préparation des tubes avec milieu MH + molécule à tester

➤ Préparation de la gamme de Cx1 en milieu MH

Dans des tubes en verre stériles, à bouchon à vis, des dilutions de la solution mère de Cx1 à 10^{-2} moles/L sont réalisées afin d'obtenir des concentrations correspondant à 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 4 et 8 fois la CMI. Pour cela, une solution équivalente à 10 fois la concentration la plus élevée est préparée en eau distillée stérile puis stérilisée par filtration sur filtres 0,22 µm dans un tube Falcon. Dans des tubes en verre stériles, les dilutions nécessaires sont effectuées dans 5 mL de MH.

➤ Sélection de mutants résistants

La pureté de la souche bactérienne ensemencée en bouillon est vérifiée par observation de la gélose MH ensemencée en parallèle et par réalisation d'une coloration de Gram.

- dans les tubes de la gamme, 10 µL de la suspension bactérienne sont déposés ;
- la gamme est incubée 24 h à 35°C ;
- le lendemain, nous observons la croissance des différents points de gamme : il faut considérer le tube pour lequel la croissance bactérienne est visible pour la plus forte concentration de molécule ;
- 10 µL de ce tube sont ensemencés dans chacun des tubes d'une nouvelle gamme de milieu MH + Cx1 ;
- la gamme est incubée 24 h à 35°C ;
- **30 PASSAGES sont ainsi réalisés.**

A chaque passage, l'absorbance de la gamme est lue, après 24 h de croissance, sur lecteur de plaque ELISA à 540 nm. Pour cela :

- transférer le contenu de chacun des tubes dans un case d'une multi-cuve ;
- prélever 100 µL et les déposer dans 8 puits (1 colonne) d'une plaque de 96 puits à fond en U ;

- lire l'absorbance à 540 nm et tracer un histogramme afin d'évaluer l'évolution de l'absorbance de la gamme au jour le jour.

Pour la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853, à chaque passage est noté la présence ou non de pigment pyocyanique à la surface de chacun des tubes de gamme. Un histogramme est tracé afin d'évaluer l'évolution de la production de pigments.

La **CMI par méthode de microdilution en milieu liquide** (cf. protocole correspondant, [Grare et al., 2007a]) est déterminée tous les 5 passages : P0, P1, P5, P10, P15, P20, P25, P30. Les souches sont ensemencées sur gélose MH et sur gélose au sang (TSA, ref. 43001, bioMérieux) afin d'observer l'aspect macroscopique des colonies. Sur ces colonies ainsi que sur les bouillons a été réalisée une **coloration de Gram**

A noter que pour *E. coli* ATCC 25922, nous avons surveillé l'évolution de la susceptibilité aux antibiotiques classiquement utilisés en routine, par méthode de dilution automatisée en milieu liquide (Vitek-2, bioMérieux, Laboratoire de Bactériologie, CHU Nancy). Nous avons en parallèle analyser la taille et la structure des souches obtenues tous les 5 passages et après arrêt de la pression de sélection, par cytométrie en flux (EPICS-XL, Beckman Coulter, Laboratoire de Biochimie, CHU Nancy).

≈ Arrêt de la pression de sélection

Tous les 5 passages, la pression de sélection par le Cx1 est arrêtée :

- prélever 10 µL de la suspension bactérienne P5, P10, P15, P20, P25, ou P30 ;
- les déposer dans un tube en verre stérile contenant 5 mL de milieu MH ne contenant pas la molécule à tester ;
- Incuber 24 h à 35°C ;
- Le lendemain, prélever 10 µL de la suspension Px sans molécule P1, et les déposer dans un tube contenant 5 mL de milieu MH : solution Px sans molécule P2...

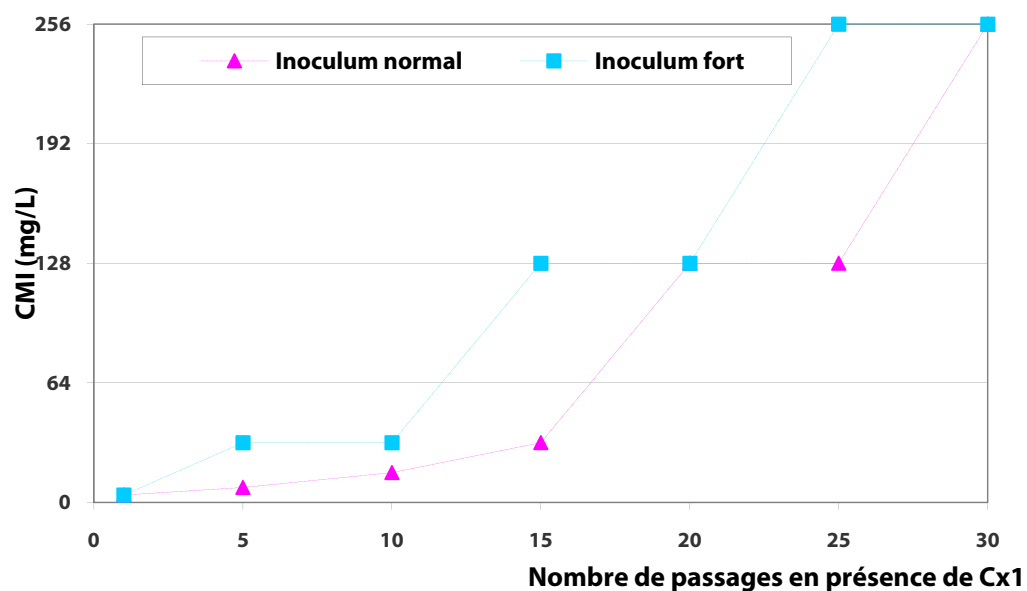


Figure 71 : Evolution de la CMI lors d'expositions répétées au Cx1 pour *E. coli* ATCC 25922 (n = 6).

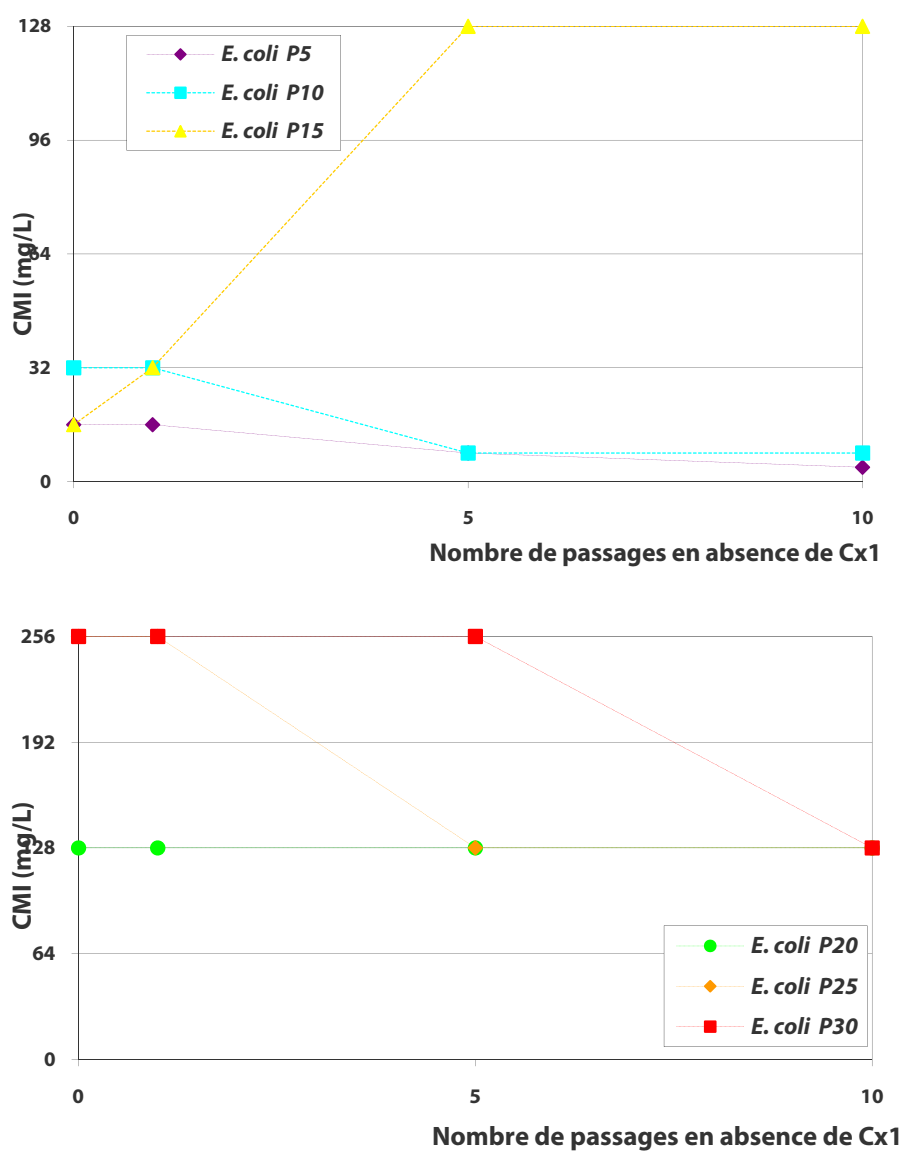


Figure 72 : Evolution de la CMI après arrêt de la pression de sélection pour *E. coli* ATCC 25922 (n = 6).

- etc. ... jusqu'à Px sans molécule P10.

La CMI par méthode de microdilution en milieu liquide (cf. protocole correspondant) est déterminée après 1, 5 et 10 passages en l'absence de molécule (vérification de la stabilité de la mutation).

Interprétation

On considère que la souche observée a muté lorsque l'on obtient une augmentation de la CMI de plus de 4 fois après 20 passages ou moins.

Chaque expérience a été réalisée 6 fois. Les résultats présentés sont la moyenne de ces 6 expériences.

IV. RÉSULTATS

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une communication affichée internationale :

9. **Grare M.**, Ribon A., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.-B., Finance C., Duval R.E.

In vitro mutation studies with a new promising compound, the *para*-guanidinoethylcalix[4]arene

48th ICAAC, October, 22-25th, 2008, Washington, USA

IV.1. Résultats obtenus pour *E. coli* ATCC 25922

IV.1.1. Evolution de la CMI en présence de Cx1

La CMI initiale du Cx1 est de 4 mg/L pour *E. coli* ATCC 25922. L'apparition de mutants résistants est donc considérée lorsque nous obtenons une CMI équivalente à 64 mg/L (perte de 4 dilutions).

Lors d'une exposition répétée au Cx1, la sélection de mutants résistants survient au bout de 20 et 15 passages pour *E. coli* ATCC 25922, respectivement pour l'inoculum normal (10^6 UFC/mL) et l'inoculum fort (10^8 UFC/mL) (Figure 71). Au-delà de ce seuil, les CMI s'accroissent pour atteindre une valeur maximale de 256 mg/L après 30 passages. Ainsi, nous avons constaté un effet inoculum avec :

(i) une différence au niveau non seulement du délai de sélection des mutants (P15 pour inoculum fort

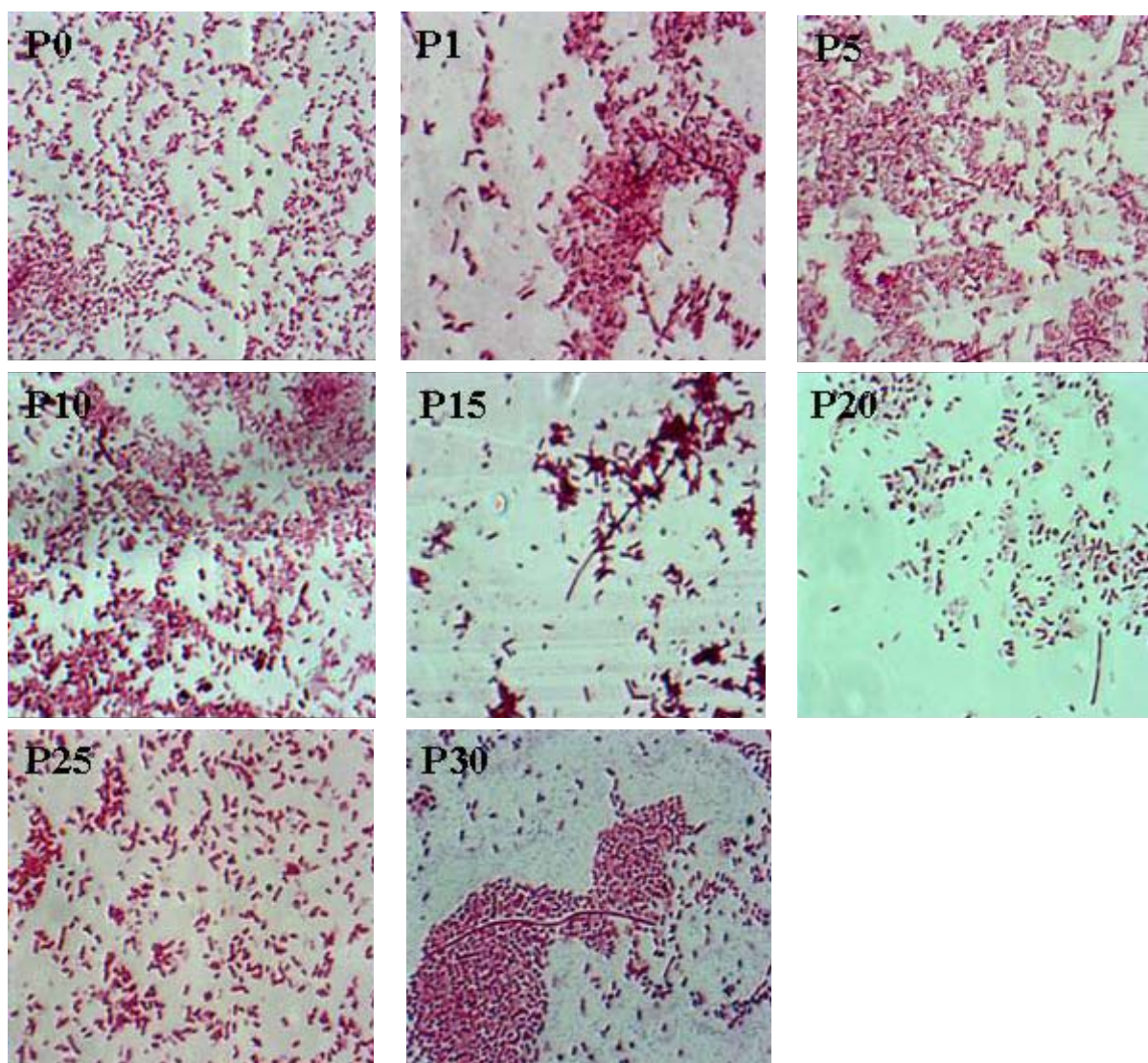


Figure 73 : Aspect microscopique de la souche *E. coli* ATCC 25922 après 1 à 30 passages en présence de Cx1. Les colorations de Gram sont réalisées à partir du dernier bouillon MHB présentant une croissance après 24 h d'incubation.

contre P20 pour inoculum normal), mais aussi (ii) au niveau de la stabilité de ces mutants (plus stables lorsque l'inoculum est plus faible).

Le Cx1 induit la sélection de mutants résistants, avec un effet inoculum, après un nombre élevé de passages.

IV.1.2. Evolution de la CMI après arrêt de la pression de sélection

Après arrêt de la pression de sélection, *E. coli* ATCC 25922 retrouve progressivement sa CMI initiale, après 5 et 10 passages en présence de Cx1 (Figure 72). De façon paradoxale, nous observons une augmentation de la CMI, après 15 passages en présence de Cx1, lors de l'arrêt de la pression de sélection : CMI 32, 64, 128 mg/L, respectivement après 1, 5 et 10 passages en absence de Cx1. A partir de P20 (passage pour lequel nous sommes en présence de mutants, CMI > 64 mg/L), nous obtenons une décroissance de la CMI après arrêt de la pression de sélection, mais sans retour à la CMI initiale (Figure 72).

IV.1.3. Observation microscopique de la souche *E. coli* ATCC 25922 au cours des passages

Deux observations essentielles ont pu être réalisées par coloration de Gram :

- nous avons obtenu des bactéries filamenteuses, de longueur très augmentée par comparaison à la morphologie initiale de la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 (Figure 73), et cela dès P1.
- la population bactérienne était de plus en plus hétérogène au fur et à mesure des passages, avec une taille et une épaisseur variable, et une coloration de Gram variable : du rose très pâle au rose franc voire violacé (Figure 73).

Concernant l'aspect macroscopique des colonies obtenues sur gélose MH et TSA, aucune modification majeure n'a pu être remarquée, si ce n'est la coexistence de grosses et de petites colonies à partir de P15, identifiées par Vitek2 comme étant toutes deux des souches de *E. coli* présentant la même sensibilité aux antibiotiques.

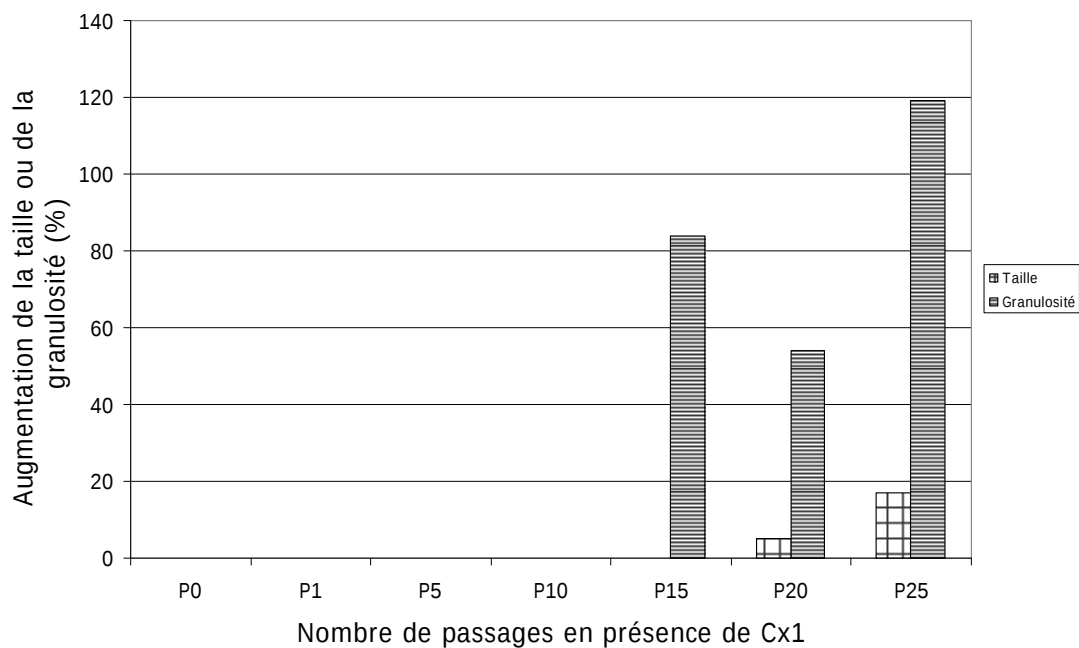


Figure 74 : Evolution de la taille et de la granulosité de la souche *E. coli* ATCC 25922, au cours des passages (analyse FSC/SSC par cytométrie en flux) (n = 2).

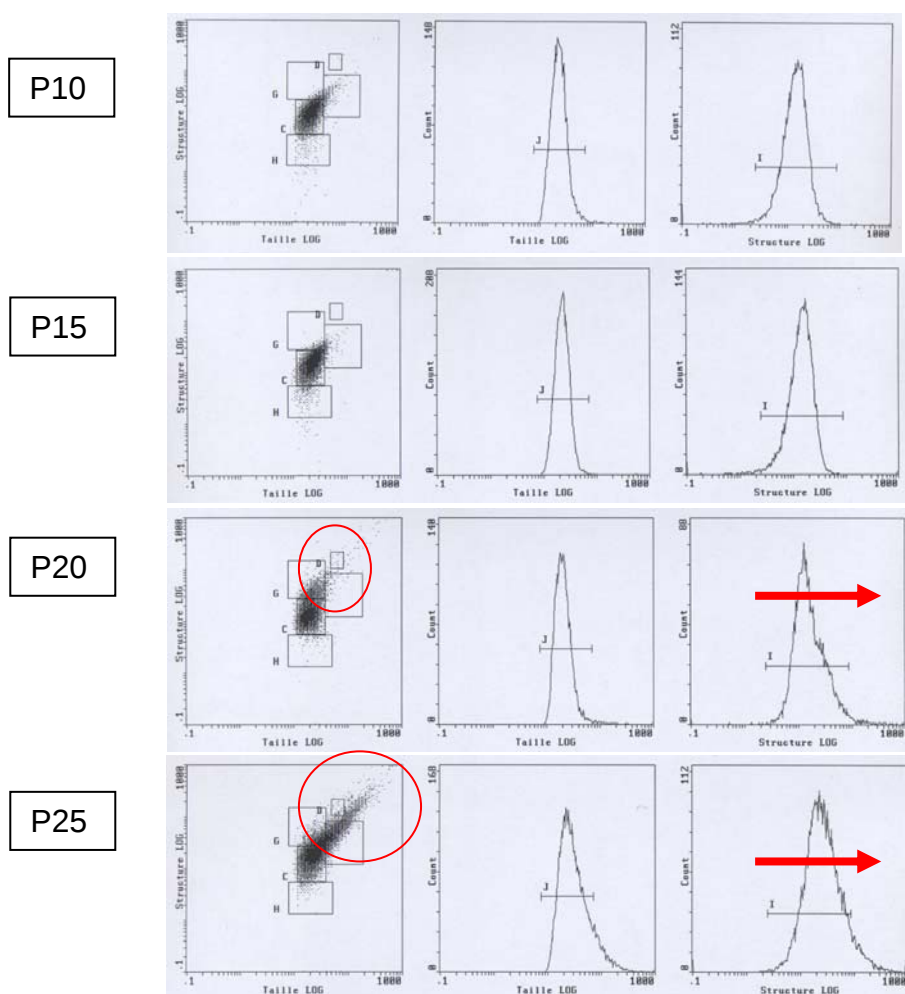


Figure 75 : Cytogrammes de répartition FSC/SSC (en $\log_{10}$).

IV.1.4. Evaluation par cytométrie en flux, de l'évolution morphologique de *E. coli* ATCC 25922 au cours des passages

Les données obtenues en terme de taille et de structure ont été analysées à partir des histogrammes de répartition FSC et SSC. Le pourcentage d'augmentation de la taille ou de la granulosité a été calculé à partir des moyennes des courbes de répartition, obtenues pour deux séries d'expériences de génération de mutants résistants. Cette méthode est approximative mais permet tout de même de toucher assez finement les modifications des souches en termes de taille et d'hétérogénéité structurale.

Ainsi, nous avons observé une augmentation significative de la granulosité et de l'hétérogénéité de la population à partir de P15, passage pour lesquels nous avons obtenu les premiers mutants résistants au Cx1 : +80% à P15, +50% à P20 et +120% à P30 (Figure 74). La taille moyenne n'est que peu modifiée, si ce n'est à P30, où la longueur des bacilles est augmentée de 20% (Figure 74). Cela confirme les observations microscopiques par coloration de Gram : hétérogénéité très importante de la population avec cependant quelques éléments filamenteux.

Figure 75 sont présentés les cytogrammes de répartition FSC/SSC (en log). Nous pouvons observer un éclatement de la population, avec un déplacement vers les éléments hétérogènes de grande taille. La région C est la région centrale, où se regroupe la majorité des bactéries en absence de traitement. La région G est le témoin d'une augmentation de l'hétérogénéité de structure, la région H de sa diminution. Enfin, la région F est le reflet d'une augmentation à la fois de l'hétérogénéité de structure et de la taille. Sur les histogrammes « taille seule » ou « structure seule », les régions J et I respectivement permettent d'évaluer la moyenne et la médiane de distribution des différentes populations.

Après arrêt de la pression de sélection, les bactéries ont été suivies, en terme de taille et de granulosité, par cytométrie en flux, de même que précédemment. Nous avons observé après 5, 15 et 20 passages en présence de Cx1, une diminution significative de la granulosité (-10 à -45%) après remise en culture en milieu dépourvu de Cx1, ce qui semble traduire une reprise de la multiplication et de la division bactérienne, en l'absence de pression de sélection (Figure 76).

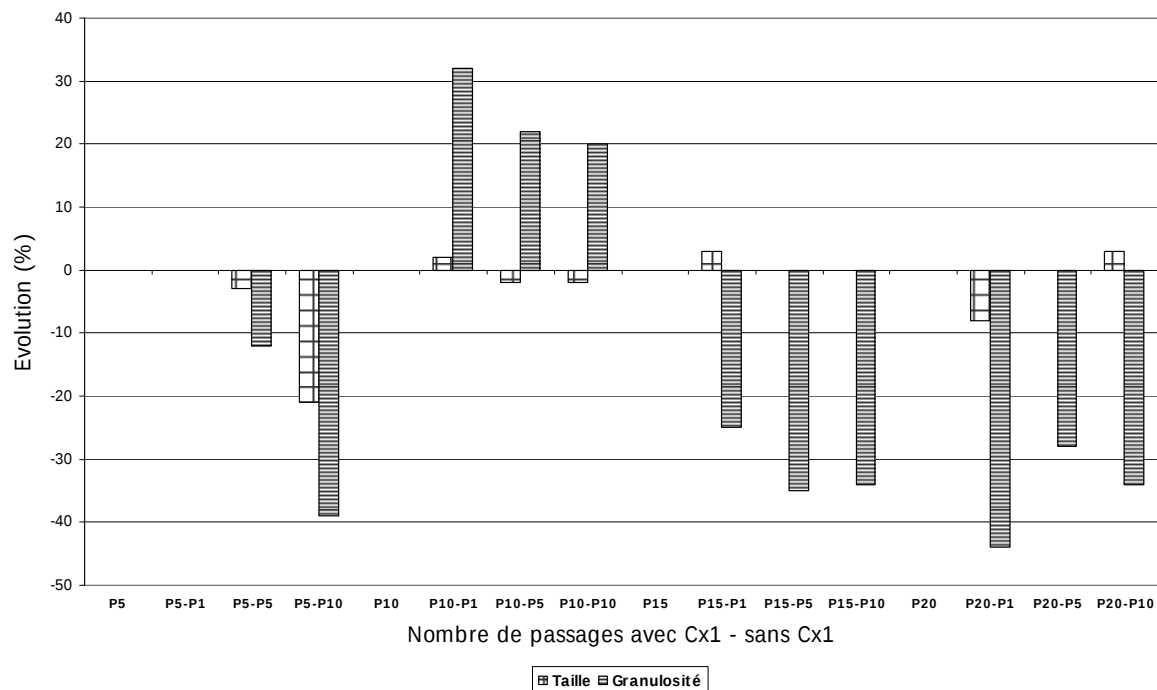


Figure 76 : Evolution de la taille et de la granulosité de la souche *E. coli* ATCC 25922, après arrêt de la pression de sélection (analyse FSC/SSC par cytométrie en flux) (n = 2). Le % est déterminé par comparaison aux données obtenues pour la souche avant arrêt de la pression (100%).

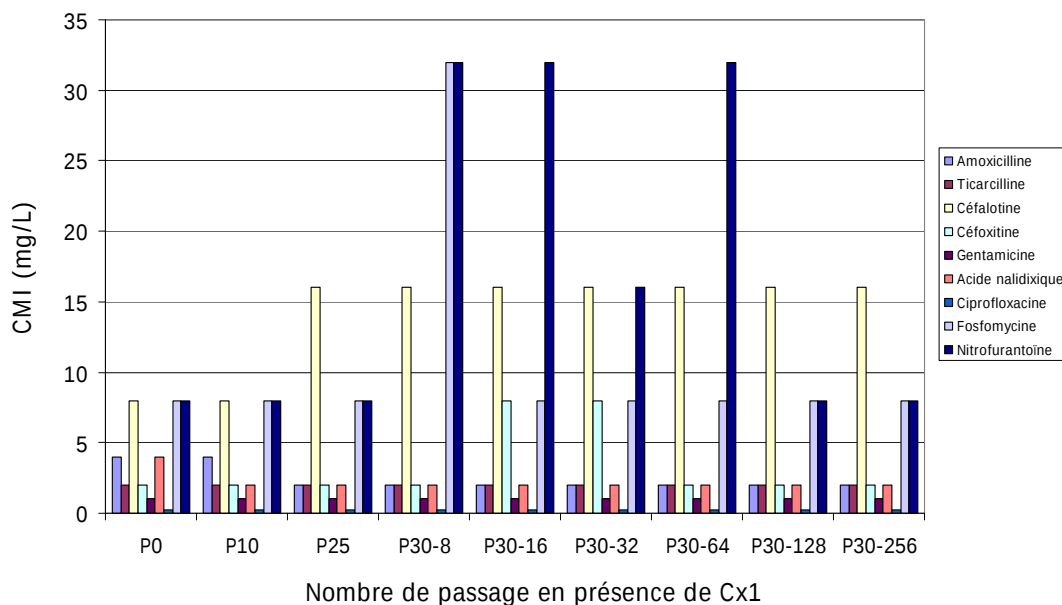


Figure 77 : Evolution de la susceptibilité d'*E. coli* ATCC 25922 aux antibiotiques (CMI) au cours des passages. Sont représentés les CMI de 9 antibiotiques à P0, P10, P25 et P30 (pour ce passage, l'étude a été menée pour les différents points de gamme, suivant la concentration de Cx1 auxquelles la souche est exposée).

Aucune modification significative de la taille n'est obtenue, mis à part pour P5 après 10 passages en absence de Cx1 (-20%) (Figure 76). Cela correspond au retour à la CMI initiale (4 mg/L). Un élément intéressant à noter, par ailleurs, est la diminution conjointe de taille et de granulosité à P20-P1 (division des formes filamenteuses = division du contenu en ADN = diminution de la granulosité et de la taille). Cela est suivi d'un « effet rebond » avec faible ré-augmentation de la taille et de la granulosité (reprise du fitness en l'absence de pression de sélection ?).

IV.1.5. Evolution de la sensibilité aux antibiotiques (analyse sur Vitek2, bioMérieux)

La susceptibilité de la souche *E. coli* ATCC 25922 a été évaluée à différents passages, par technique de microdilution en milieu liquide, semi-automatisée (Vitek2, bioMérieux – laboratoire de Bactériologie, CHU Nancy).

Nous avons observé une augmentation de 1 ou 2 dilutions pour les CMI de la céfalotine, de la céfoxitine, de la fosfomycine et de la nitrofurantoïne à partir de P25 ou P30 (Figure 77). Cette évolution n'est pas significative puisqu'elle ne modifie pas la catégorisation des souches (sensibles), sauf pour la céfalotine, pour laquelle les souches sensibles deviennent intermédiaires.

Après 15 passages en présence de Cx1 puis 10 passages sans Cx1, *E. coli* a perdu en plus la sensibilité à l'association pipéracilline-tazobactam (CMI 8 au lieu < 4 µg/mL), à la céfoxitine (céphalosporine de 2^{ème} génération) (CMI 8 au lieu < 4 µg/mL), et au céfixime (céphalosporine 3^{ème} génération, voie orale) (CMI 1 au lieu < 0,25 µg/mL).

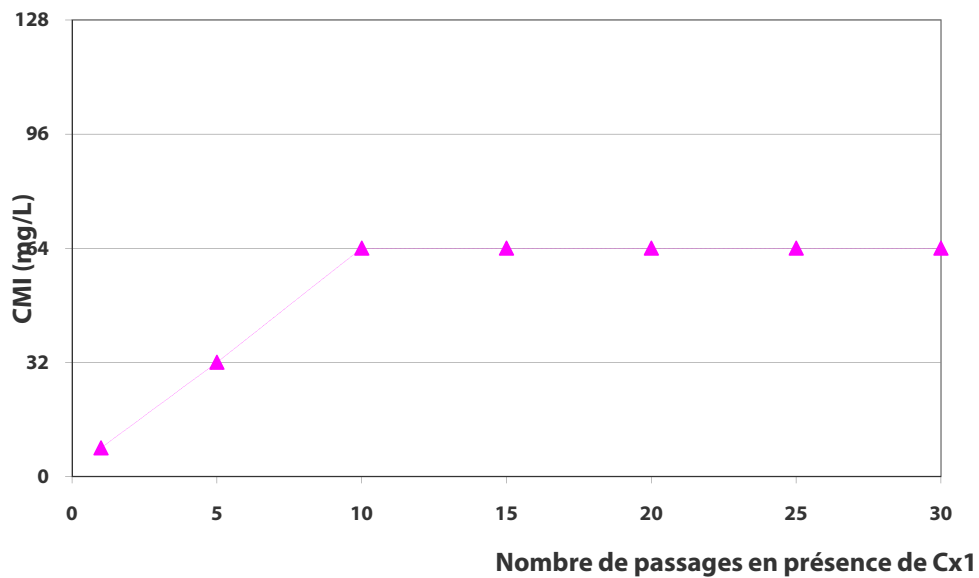


Figure 78 : Evolution de la CMI pour *S. aureus* ATCC 29213 en présence de Cx1 (n = 6).

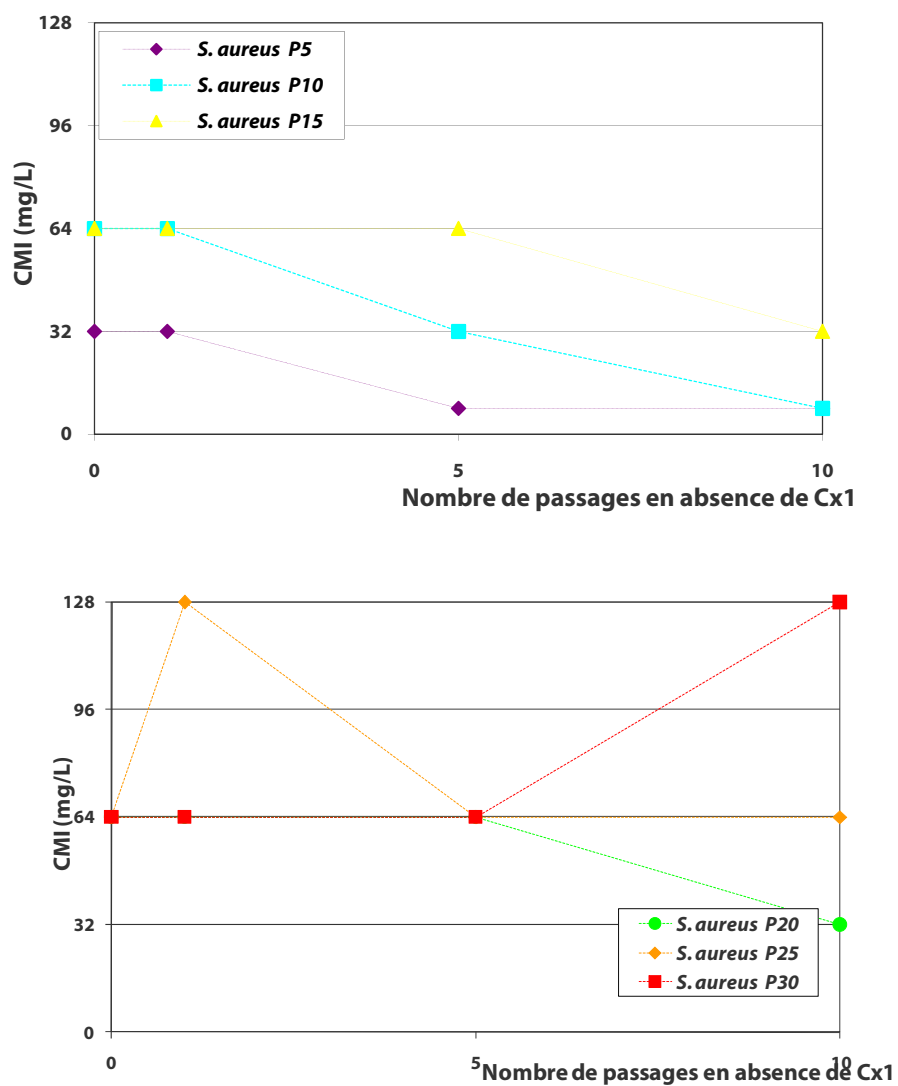


Figure 79 : Evolution de la CMI après arrêt de la pression de sélection pour *S. aureus* ATCC 29213 (n = 6).

IV.2. Résultats obtenus pour *S. aureus* ATCC 29213

IV.2.1. Evolution de la CMI en présence de Cx1

La CMI initiale du Cx1 est de 8 mg/L pour *S. aureus* ATCC 29213. L'apparition de mutants résistants est donc considérée lorsque nous obtenons une CMI équivalente à 128 mg/L (perte de 4 dilutions).

Lors d'une exposition répétée au Cx1, aucun mutant résistant n'a été mis en évidence pour *S. aureus* ATCC 29213 (Figure 78). Un maximum de 64 mg/L est obtenu dès P10, et se maintient jusqu'à P30.

IV.2.2. Evolution de la CMI après arrêt de la pression de sélection

Après arrêt de la pression de sélection, *S. aureus* ATCC 29213 retrouve progressivement sa CMI initiale, après 5 et 10 passages en présence de Cx1 (Figure 79). Après 15 à 30 passages, nous avons obtenu une décroissance de la CMI, dans retour à la CMI initiale.

Aucune investigation complémentaire n'a été menée, puisque aucun mutant résistant n'a pu être détecté par cette technique.

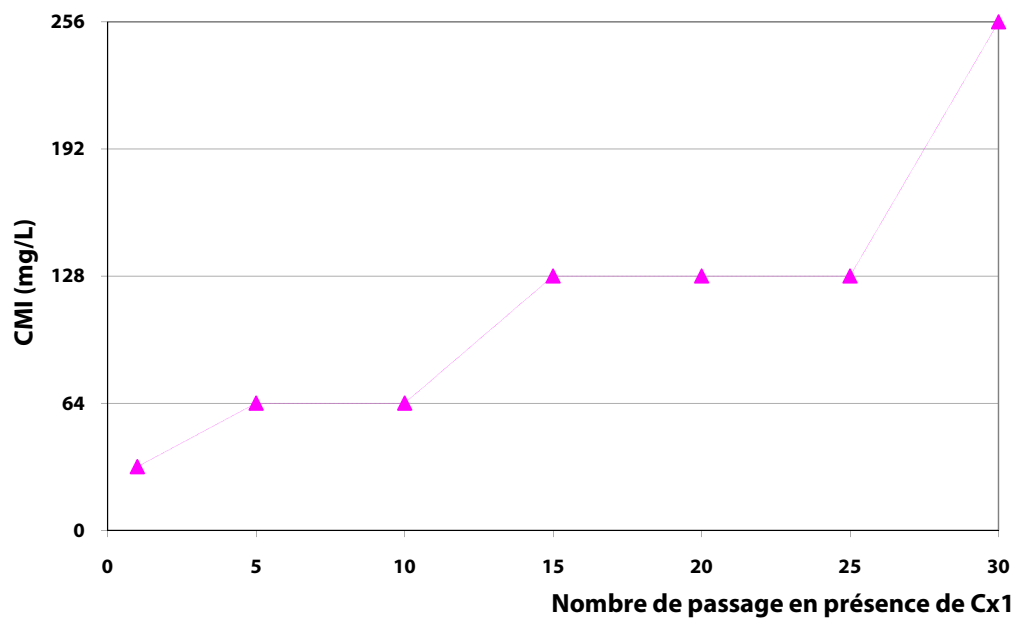


Figure 80 : Evolution de la CMI pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 en présence de Cx1 (n = 6).

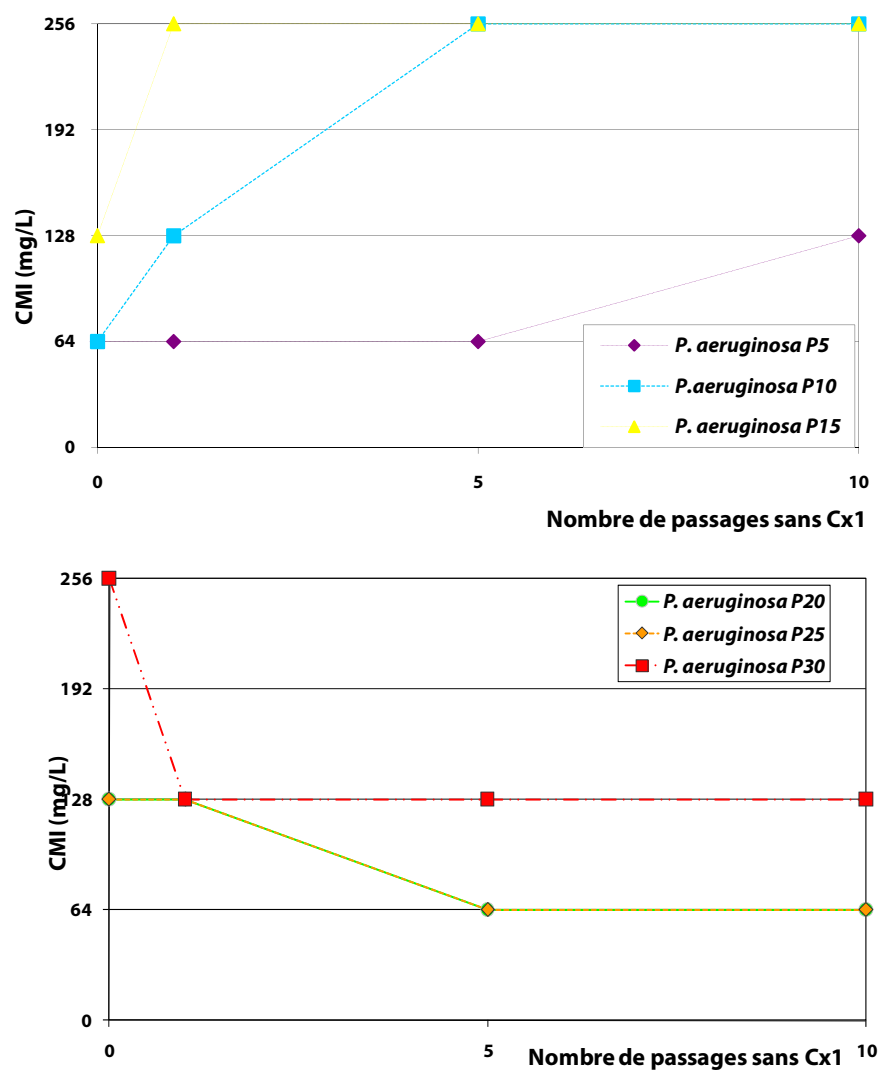


Figure 81 : Evolution de la CMI après arrêt de la pression de sélection, pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 (n = 6).

IV.3. Résultats obtenus pour *P. aeruginosa* ATCC 27853

IV.3.1. Evolution de la CMI en présence de Cx1

La CMI initiale du Cx1 est de 32 mg/L pour *P. aeruginosa* ATCC 27853. L'apparition de mutants résistants est donc considérée lorsque nous obtenons une CMI équivalente à 512 mg/L (perte de 4 dilutions).

Lors d'une exposition répétée au Cx1, aucun mutant résistant n'a été mis en évidence pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figure 80). Un pallier à 128 mg/L est obtenu dès P10 et se maintient jusqu'à P25. Un maximum de 256 mg/L est obtenu pour P30.

IV.3.2. Evolution de la CMI après arrêt de la pression de sélection

Après arrêt de la pression de sélection, *P. aeruginosa* ATCC 27853 retrouve progressivement sa CMI initiale, après 5, 10 et 15 passages en présence de Cx1 (Figure 81). Après 20, 25 et 30 passages, nous avons obtenu une décroissance de la CMI, sans retour à la CMI initiale.

IV.3.3. Evolution de la production de pigments pyocyaniques

Lors des manipulations avec *P. aeruginosa* ATCC 27853, nous avons suivi la production de pigments dans les 6 tubes de gamme, chaque jour. Etaient notés le dernier tube pour lequel le pigment était observé, ainsi que le dernier tube où nous avons obtenu une croissance bactérienne.

Il est intéressant de noter que la production de pigment ne correspond pas à la croissance bactérienne. Pour les concentrations les plus fortes en Cx1, nous avons noté une absence de pigment (1 ou 2 dilutions de différence entre les deux observations) (Figure 82). Nous avons par ailleurs observé 3 intervalles de temps au cours desquels la production est quasi-nulle, quelque soit le point de gamme considéré : P3-P5, P14-P15, P26-P27. Cet effet de « vague » est parfaitement superposable d'une expérience à une autre ($n = 6$) ; ce qui élimine l'hypothèse d'une carence nutritionnelle liée à un défaut du milieu MH.

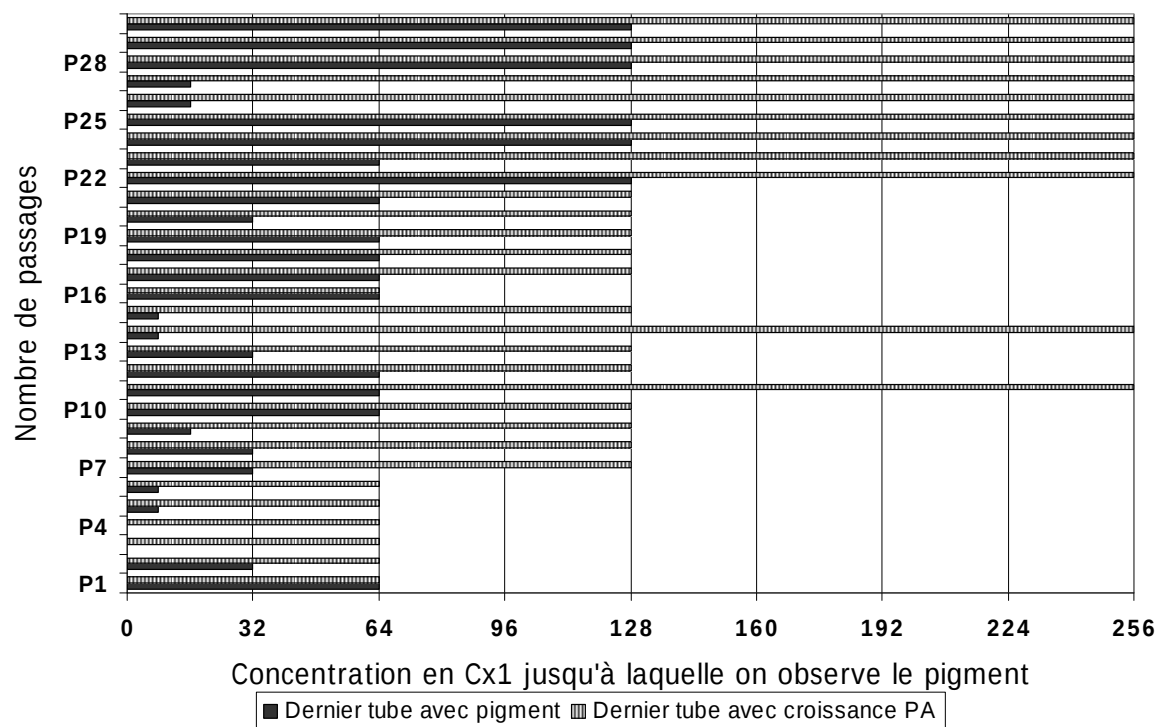


Figure 82 : Evolution de la production de pigments pyocyaniques au cours de la sélection de mutants, pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 (n=6).

De façon surprenante et intéressante, cela correspond aux différents points d'inflexion de la courbe d'évolution de la CMI en fonction du nombre de passages : P5 = passage de 32 à 64 mg/L, P15 = passage de 64 à 128 mg/L, P25 = passage de 128 à 256 mg/L.

V. DISCUSSION

1^{ère} conclusion : en présence de Cx1, une sélection de mutants *in vitro*

- est obtenue à partir de P15 ou P20 pour *Escherichia coli* ATCC 25922 (N.B. : selon les publications, on considère les mutants lorsque l'on obtient une CMI ≥ 4 dilutions de la CMI initiale) (CMI = 64 mg/L à partir de P15 ou P20, 256 mg/L pour P30, contre 4 mg/L pour la CMI initiale).
- n'est pas obtenue pour *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (CMI = 64 mg/L à partir de P15 ou P25 selon la gamme, mais jamais atteinte de 128 mg/L, contre 8 mg/L pour la CMI initiale).
- n'est pas obtenue pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (augmentation graduelle de la CMI sans jamais atteinte de 512 mg/L, contre 32 mg/L pour la CMI initiale).

La sélection de mutants résistants apparaît donc genre-dépendant.

2^{ème} conclusion : stabilité des mutants au cours du temps

Les mutants obtenus sont stables et d'autant plus stables que le nombre de passages est important : restauration de la CMI de départ après arrêt de la pression de sélection à P5 et/ou P10, perte d'une ou deux dilutions pour les passages $\geq$ P15, mais sans restauration de la CMI initiale.

Concernant les mutants obtenus pour *E. coli* ATCC 25922, différentes hypothèses peuvent être formulées concernant le mécanisme conduisant aux mutations stables, et concernant les cibles d'action du Cx1 :

1. par coloration de Gram, et par cytométrie en flux (FSC/SSC), nous avons observé une augmentation de la taille et de la granulosité (hétérogénéité) des bacilles, avec apparition de formes filamenteuses, à coloration ponctuée, prenant moins bien la coloration de Gram.

➔ ... La question se pose donc éventuelle atteinte du métabolisme (ralentissement), ou d'une cible intracellulaire autre induisant des dommages à l'ADN, entraînant ainsi une levée de la répression de LexA (gène répresseur), et/ou une induction du système SOS sous pression de sélection. Des études ont d'or et déjà montré l'implication du système SOS dans la réponse à certains antibiotiques et dans certains mécanismes de résistance des bactéries. L'existence de formes filamenteuses est en effet le témoin d'un arrêt de la division cellulaire, avec accumulation d'acides nucléiques dans le cytoplasme. Ce phénomène, conjugué à une altération de la paroi, peuvent expliquer l'augmentation de la granulosité.

➔ L'existence d'un « rebond » après arrêt de la pression de sélection pourrait s'expliquer par : (i) une stimulation de l'expression de la résistance après arrêt de la pression de sélection et/ou (ii) la récupération d'un fitness plus favorable en l'absence de Cx1. Nous ne connaissons ni la cible intracellulaire du Cx1, si elle existe, ni si cette molécule est capable d'induire des mutations entraînant une modification du métabolisme bactérien ou du fitness.

➔ Après arrêt de la pression de sélection, nous avons obtenu pour la plupart des souches, une diminution significative de la granulosité (SSC) avec une réduction moindre de la taille (FSC). Cela pourrait s'expliquer par une reprise de la division bactérienne (répartition du contenu en acide nucléiques), et de la synthèse pariétale.

2. au cours des différents passages, nous avons observé une diminution de la sensibilité des souches à différents antibiotiques : céfalotine, céfoxitine, fosfomycine (nitrofurantoïne).

➔ L'ensemble de ces antibiotiques agissent sur la synthèse du peptidoglycane, ou sur la paroi bactérienne, à différents niveaux. Le Cx1 pourrait induire une modification de la paroi bactérienne, entraînant une modification de la sensibilité des mutants à ces antibiotiques.

➔ Le dégradé de coloration obtenu par Gram, pourrait s'expliquer par une atteinte graduelle de la paroi bactérienne, avec rétention plus ou moins importante de la coloration.

Chapitre 7

A LA RECHERCHE DE LA OU DES CIBLE(S) D'ACTION :
APPROCHE MICROMETRIQUE & NANOMETRIQUE DES
PROPRIETES PARIETALES

GRARE ET AL., 2007B, PATHOLOGIE BIOLOGIE. 55:465-471.

I. OBJECTIFS

Les bactéries présentent une charge globale nette de surface négative. Il a été postulé que le Cx1, composé polycationique, pourrait agir au niveau de la paroi bactérienne par réorganisation des charges de surface, cette neutralisation ou cette désorganisation pouvant résulter en un effet délétère. La microélectrophorèse nous permet d'évaluer à la fois la charge globale de surface, et les propriétés de perméabilité de la paroi bactérienne.

L'objectif de l'étude en microélectrophorèse est de savoir si après 24 h de contact avec une molécule d'intérêt, ces différentes propriétés sont modifiées ou non. L'AFM permet quant à elle, non seulement d'obtenir des images (mode contact), mais aussi de déterminer les forces régissant les interactions entre la pointe et la surface (spectroscopie de force). L'objectif de cette étude est donc de mettre en évidence des altérations de la paroi bactérienne (images), mais aussi une modification des forces d'interaction.

Les expériences de microélectrophorèse ont été réalisées en collaboration avec Etienne Dague, doctorant, au sein de l'UMR 7564 (directeur Pr. J.-C. Block).

II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

GRARE ET AL., 2007B, PATHOLOGIE BIOLOGIE. 55:465-471.

III. MATÉRIELS & MÉTHODES

III.1. Microélectrophorèse

III.1.1. Principe

Les bactéries sont mises en suspension dans une solution de KNO_3 de force ionique croissante, sous agitation. Au niveau de la cellule de mesure, la vitesse de déplacement des bactéries (mobilité électrophorétique) est mesurée par application d'un champ électrique. Les bactéries chargées négativement vont se déplacer vers le pôle positif. Leur mobilité électrophorétique dépend de leur charge de surface et de la densité des polymères de surface.

III.1.2. Matériel & Réactifs

Tubes en verre stériles

Tubes Falcon 15 et 50 mL

Filtres 0,22 µm (filtres Millex®GP, 0,22 µm, Millipore, France)

Bouillons Mueller Hinton (Difco, 275730)

Géloses Mueller Hinton (Difco, 225250)

Solutions de KNO₃ 0,001 M et 2 M stériles (préparation extemporanée à chaque expérience)

Eau distillée stérile

Eau MilliQ

Solution de la drogue à tester : Cx1 (M = 1221,11 g/mol) et mCx1 (M = 293,24 g/mol) sont fournies par le Pr. Regnoul de Vains sous forme de poudre blanche, reprises en eau distillée stérile et filtrées sur 0,22 µm pour obtenir une solution stérile à 10⁻² mol/L. Une nouvelle solution est préparée au minimum chaque semaine, et conservée à +4°C.

III.1.3. Souches bactériennes et molécules étudiées

Quatre souches de référence ont été utilisées, correspondant à celles étudiées pour les CMI : *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Les bactéries sont cultivées en bouillon MH ou sur gélose MH, à 35°C.

Pour chaque souche, il a été choisi de tester une concentration correspondant à 0,5 x CMI ainsi qu'une concentration correspondant à la CMI. Lors d'une seule et même manipulation seront testés les deux concentrations pour chacune des molécules : hexamidine, Cx1, mCx1, ainsi que l'antibiotique de référence correspondant à la souche évaluée (amoxicilline & ticarcilline pour *E. coli* ATCC 25922, pénicilline G pour *S. aureus* ATCC 29213, amoxicilline pour *E. faecalis* ATCC 29212 et ticarcilline pour *P. aeruginosa* ATCC 27853). Les antibiotiques ont été obtenus sous forme de poudre blanche, par les différents fabricants. L'hexamidine est obtenue par évaporation d'une solution alcoolique à 1%, comme décrit précédemment [Grare et al., 2007b].

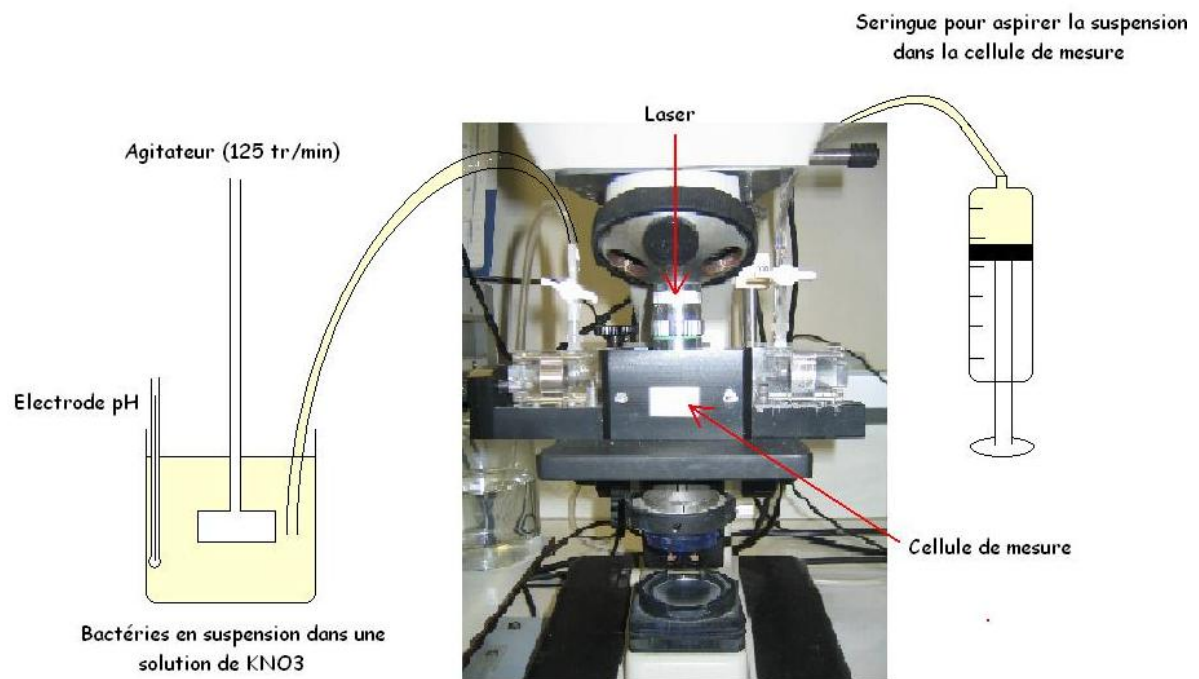


Figure 83 : Schéma simplifié de l'appareillage de microélectrophorèse.

III.1.4. Mode opératoire

J-4 : *Isolement des bactéries sur gélose MHA*

J-3 : *Mise en bouillon MHB*

Ensemencer 5 mL de bouillon MH avec une colonie – Incuber 24 h à 35°C.

J-2 : *Ré-ensemencement en bouillon MH*

Agiter au vortex les bouillons de 24 h

Prélever 10 µL pour ensemencer 5 mL de bouillon MH frais. Incuber 24 h à 35°C.

J-1 : *Mise en contact avec la drogue*

Ø Etude témoin (bactéries non traitées)

Agiter au vortex les bouillons de 24 h

Prélever 10 µL pour ensemencer 5 tubes de 5 mL de bouillon MH frais. Incuber 24 h à 35°C.

Ø Etude de l'effet de différentes molécules antibactériennes

Préparer une solution mère en eau distillée à partir de la solution mère à 10^{-2} M (Cx1, mCx1, hexamidine), ou à 10 mg/L (antibiotiques) ; puis préparer 5 x 5 mL de chacune des solutions test en bouillon MH, dans 5 tubes en verre stériles.

Prélever 10 µL de la suspension bactérienne pour ensemencer 5 tubes de 5 mL de bouillon MH frais. Incuber 24 h à 35°C.

J0 : *Micro-électrophorèse*

- transférer le contenu des 5 tubes dans un tube Falcon 50 mL ;
- centrifuger 10 min à 4500 g ;
- éliminer le surnageant ;
- faire un lavage puis remettre le culot en suspension dans 2 mL de KNO₃ 0,001 M.

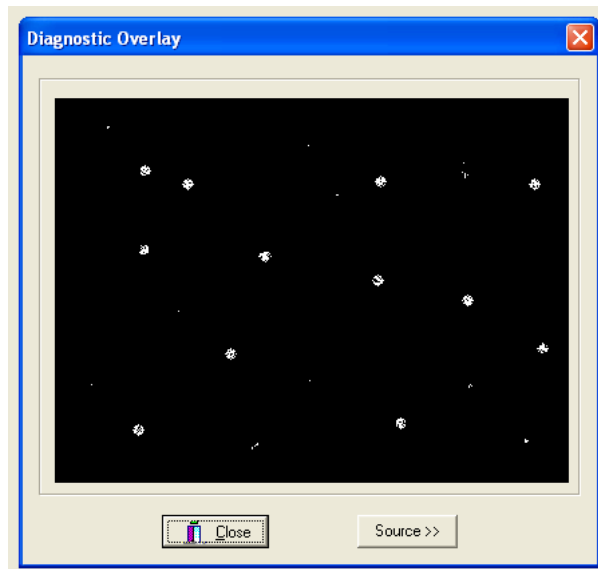


Figure 84 : Fenêtre de capture de la mobilité électrophorétique.

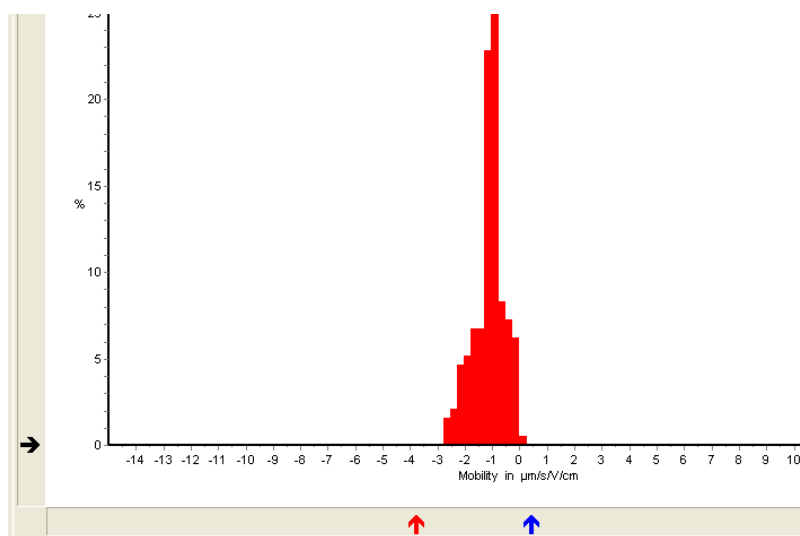


Figure 85 : Exemple d'histogramme de répartition des bactéries en fonction de leur mobilité, obtenu pour *P. aeruginosa*.

✂ Préparation de la cellule de mesure (Figure 83, schéma de l'appareillage)

- mettre 250 mL de KNO_3 0,001 M dans un bécher ;
- ajouter 1 ou 2 mL de la suspension bactérienne (selon nombre de bactéries observées dans la cellule ; doit se situer entre 50 et 150) ;
- mettre dans le bécher : l'électrode à pH et la pale de l'agitateur (vitesse : environ 140 rpm) ;
- au niveau de la cellule de mesure, ouvrir les 2 vannes, aspirer environ 20 mL à la seringue, fermer les vannes.

La mesure de la mobilité se fait ensuite grâce au logiciel ZetaPhoremeter. La fenêtre « **Inspect Sample** » : permet de voir la densité des bactéries dans la cellule de mesure, et d'observer leur mobilité intrinsèque (absence ou présence en fonction du traitement effectué) (Figure 84).

Après capture de la mobilité par la caméra et le logiciel de traitement d'image, nous obtenons l'histogramme de répartition des bactéries en fonction de leur mobilité (Figure 85). Un écran nous donne ensuite les différents paramètres de la mesure, à noter ensuite les différents paramètres sur le cahier de mesure : pH, force ionique, nombre total de bactéries, mobilité $\pm$ écart-type.

✂ Modification de la force ionique

Procéder par ajouts successifs de KNO_3 2 M en augmentant progressivement le volume ajouté (200, 500, 1000, 5000 μL ...) afin de réaliser une dizaine de mesures réparties de façon homogène entre 10^{-3} et $5 \cdot 10^{-1}$ M pour la force ionique. Avant d'effectuer la nouvelle mesure, attendre quelques minutes pour l'homogénéisation du milieu.

✂ Nettoyage du matériel lors du changement de souche bactérienne

Rincer à l'eau distillée l'électrode du pHmètre et la pale de l'agitateur.

Éliminer la suspension bactérienne restant dans le bécher dans un bocal contenant de l'eau de Javel.

Rincer ensuite le bécher à l'eau MilliQ.

Rincer la cellule de mesure par aspiration d'environ 100 mL d'eau distillée.

✂ Nettoyage du matériel à la fin de la manipulation

Rincer à l'eau distillée l'électrode du pHmètre et la pale de l'agitateur.

Remettre l'électrode à pH dans sa solution de conservation.

Éliminer la suspension bactérienne restant dans le bécher dans un bocal contenant de l'eau de Javel.

Rincer ensuite le bécher à l'eau MilliQ.

Rincer la cellule de mesure par aspiration d'environ 200 mL d'eau distillée.

III.2. Microscopie à force atomique (AFM)

III.2.1. Principe

Après 24 h de contact avec la drogue, les bactéries sont déposées sur une lame de verre recouverte de polyéthylèneimine (PEI), et maintenues en milieux aqueux (KNO_3 0,1 mol/L afin de diminuer la contribution des charges électrostatiques liées aux charges de la surface bactérienne). Les images en mode contact sont ensuite obtenues avec un levier de constante de raideur 0,01 N/m ; et les courbes de force sont réalisées par utilisation d'un levier de constante de raideur calibré.

III.2.2. Matériel & Réactifs

Tubes en verre stériles

Tubes Falcon 15 et 50 mL

Filtres 0,22 μm (filtres Millex®GP, 0,22 μm , Millipore, France)

Géloses Mueller Hinton (Difco, 225250)

Bouillons Mueller Hinton (Difco, 275730)

Solutions de KNO_3 0,1 M

Eau distillée

Eau MilliQ

Solution de la drogue à tester : Cx1 ($M = 1221,11 \text{ g/mol}$) fournie par le Pr. Regnoui de Vains sous forme de poudre blanche, reprise en eau distillée stérile et filtrée sur $0,22 \mu\text{m}$ pour obtenir une solution stérile à 10^{-2} mol/L . Une nouvelle solution est préparée au minimum chaque semaine, et conservée à $+4^\circ\text{C}$.

III.2.3. Souches bactériennes et molécules étudiées

Cette étude a été menée uniquement sur *P. aeruginosa* ATCC 27853 (pour des raisons de problème d'adhésion sur le PEI). Les molécules suivantes ont été testées : hexamidine, Cx1, mCx1, à une concentration équivalente à la CMI. A chaque manipulation a été réalisé un témoin non traité.

III.2.4. Mode opératoire

J-4 : Isolement des bactéries sur gélose MH

J-3 : Mise en bouillon MH

Ensemencer 5 mL de bouillon MH avec une colonie – Incuber 24 h à 35°C .

J-2 : Ré-ensemencement en bouillon MH

Agiter au vortex les bouillons de 24 h ;

Prélever $10 \mu\text{L}$ pour ensemencer 5 mL de bouillon MH frais. Incuber 24 h à 35°C .

J-1 : Mise en contact avec la drogue

Ø Etude témoin (bactéries non traitées)

Agiter au vortex les bouillons de 24 h ;

Prélever $10 \mu\text{L}$ pour ensemencer 4 tubes de 5 mL de bouillon MH frais. Incuber 24 h à 35°C .

Ø Etude de l'effet de différentes molécules antibactériennes

Préparer une solution mère en eau distillée à partir de la solution mère à 10^{-2} M (Cx1, mCx1, hexamidine), ou à 10 mg/L (antibiotiques) ; puis préparer $5 \times 5 \text{ mL}$ de chacune des solutions test en bouillon MH, dans 5 tubes en verre stériles.

Prélever 10 μL de la suspension bactérienne pour ensemer 5 tubes de 5 mL de bouillon MHB frais. Incuber 24 h à 35°C.

J0 : Passage des bactéries en AFM

- transférer le contenu des 5 tubes dans un tube Falcon 50 mL ;
- centrifuger 10 min à 4500 g ;
- éliminer le surnageant ;
- reprendre le culot dans 5 mL de KNO_3 0,1 mol/L ;
- après 2 lavages, le culot est repris dans 5 à 10 mL de KNO_3 0,1 mol/L, selon la densité de l'inoculum bactérien.

x 2

Au LCPME, préparation des bactéries en vue du passage en AFM :

- déposer la suspension bactérienne sur une lame de verre recouverte de PEI (solution à 2 %) ;
- laisser en contact 2 h à température ambiante ;
- rincer la lame abondamment à l'eau MilliQ ;
- recouvrir ensuite la lame de KNO_3 0,1 mol/L.

Détermination de la sensibilité du levier

Avant chaque manipulation, la sensibilité (S) du levier est déterminée par réalisation d'une quinzaine de courbes de force sur une lame de verre recouverte de KNO_3 0,1 mol/L. La sensibilité correspond à la pente de la courbe de force : déflexion du levier = f (déplacement du piézoélectrique).

Obtention des images en mode contact

Les images et courbes ont été obtenues à température ambiante, en milieu aqueux, sur un microscope commercial (Thermomicroscope Explorer EcuPlus, Veeco Instruments). Une seule pointe calibrée (MLCT-EXMT-BF, Veeco instruments) de constante de raideur égale à 0,01 % $\pm$ 10 % N/m est utilisée pour la réalisation de l'ensemble des images.

Obtention des courbes de force

Une seule pointe calibrée (MLCT-EXMT-BF, Veeco Instruments) (calibration réalisée par le Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Berlin), de constante de raideur égale à 0,0639 N/m a été utilisée pour l'ensemble des mesures de force. Ces mesures ont été effectuées en solution de KNO_3 0,1 mol/L, à la vitesse de 0,1 $\mu\text{m/s}$. Pour chaque condition testée, une trentaine de courbes ont été obtenues sur 5 à 6 bactéries. Une ou plusieurs courbes moyennes ont ensuite été calculées, selon le ou les comportements observés. Ces courbes moyennes déflexion/déplacement du piézoélectrique ont été converties en courbes de force en utilisant la constante de raideur ($k_c = 0,0639 \text{ N/m}$) et la sensibilité ($S = 0,178 \text{ A/m}$) du levier.

Les courbes d'indentation sont obtenues par suppression de l'effet lié au support. L'indentation est une longueur ; pour une force exercée donnée, elle est obtenue en soustrayant le déplacement du quartz piézoélectrique mesuré sur le support et celui enregistré sur la bactérie. Il s'agit donc de la profondeur de pénétration de la pointe dans la bactérie.

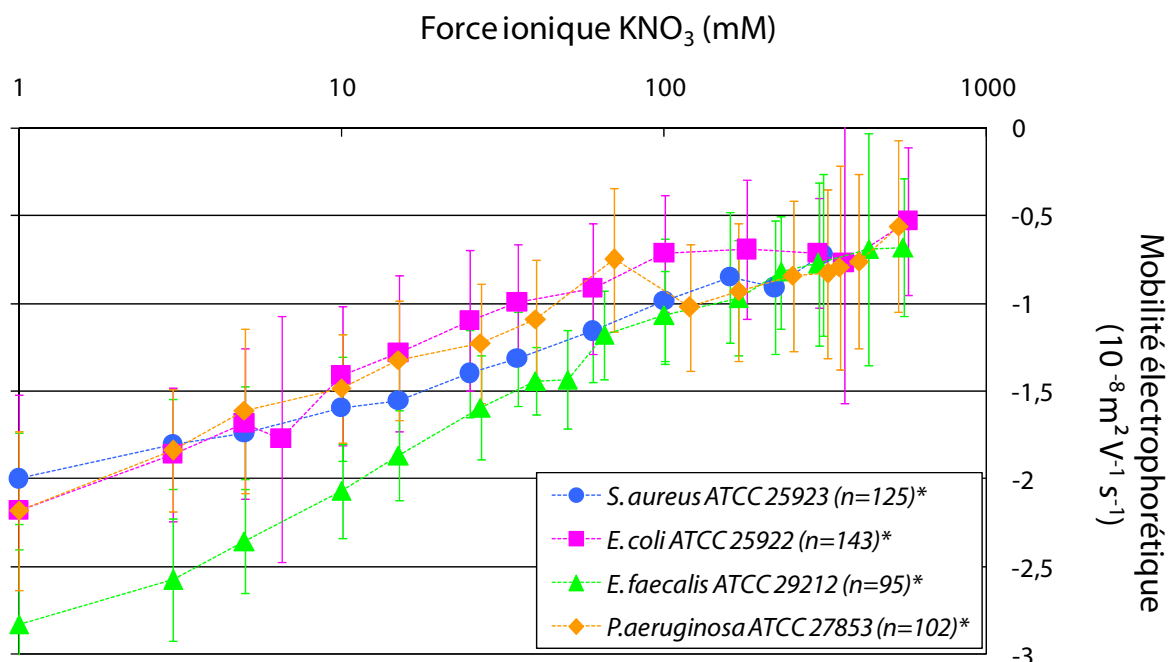


Figure 86 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique. Courbes obtenues pour *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 25922 & *P. aeruginosa* ATCC 27853. Les résultats sont exprimés en mobilité moyenne, calculée sur 5 expériences, menées sur les bactéries en absence de traitement.* nombre moyen de bactéries observées.

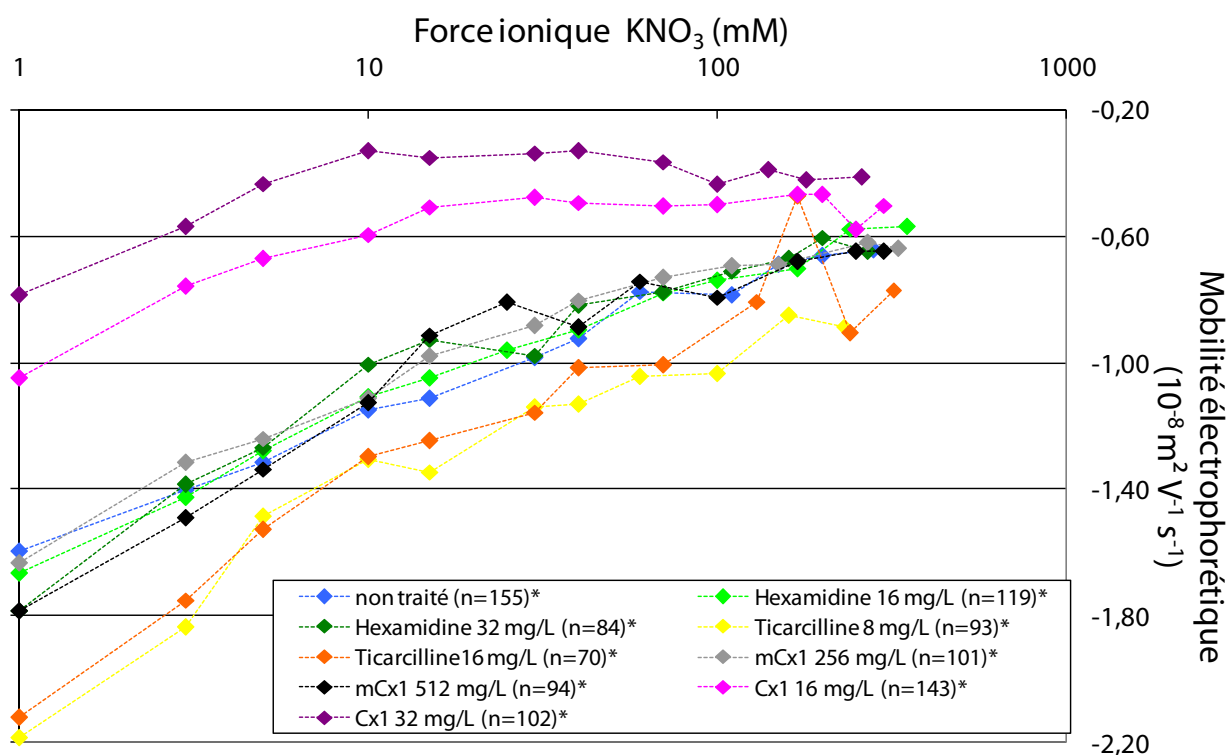


Figure 87 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique. Courbes obtenues pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 avant et après traitement (moyenne sur $n = 4$). *nombre moyen de bactéries observées.

IV. RÉSULTATS

GRARE ET AL., 2007B, PATHOLOGIE BIOLOGIE. 55:465-471.

IV.1. Microélectrophorèse

IV.1.1. Comparaison de la mobilité électrophorétique des 4 souches testées

Sur l'histogramme de répartition, la distribution apparaît plus hétérogène pour les bacilles à Gram négatif, et cette hétérogénéité se réduit lorsque la force ionique augmente. Ainsi, une distribution beaucoup plus large pour *P. aeruginosa* que pour *E. faecalis*, à la force ionique de 1 mM est observée. Cette différence s'atténue à la force ionique de 200 mM, pour laquelle un pic unique étroit est obtenu pour les deux espèces (données non présentées).

Les courbes présentées Figure 86 sont des courbes moyennes obtenues à partir de 5 expériences réalisées sur les souches bactériennes non traitées. Sur cette figure, on constate que :

- (i) les bactéries peuvent être classées comme suit par ordre croissant de mobilité électrophorétique : *E. coli* < *P. aeruginosa* < *S. aureus* < *E. faecalis*, les mobilités des trois premières souches pouvant cependant être considérées comme comparables. *E. faecalis* se distingue, avec une mobilité d'environ $-2,8.10^{-8}$ m²/V/s à une force ionique de 1 mM, contre environ $-2,1.10^{-8}$ m²/V/s pour les autres souches.
- (ii) cette différence de mobilité tend à s'atténuer avec l'augmentation de la force ionique.
- (iii) la mobilité électrophorétique des bactéries diminue lorsque la force ionique augmente, avec atteinte d'un plateau pour lequel la mobilité demeure constante quelque soit la force ionique. Ce plateau est atteint pour des forces ioniques d'environ 100 mM pour *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, et d'environ 500 mM pour *E. faecalis*. Cela s'explique par une neutralisation des charges de surface bactérienne par les cations présents en solution. Plus la force ionique est élevée, plus le nombre de cations est important et donc plus l'effet « couverture » s'accroît.
- (iv) la courbure des courbes n'est pas la même suivant les bactéries. Alors que les bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) présentent un profil électrophorétique relativement atténué (la mobilité diminue faiblement avec la diminution de la force

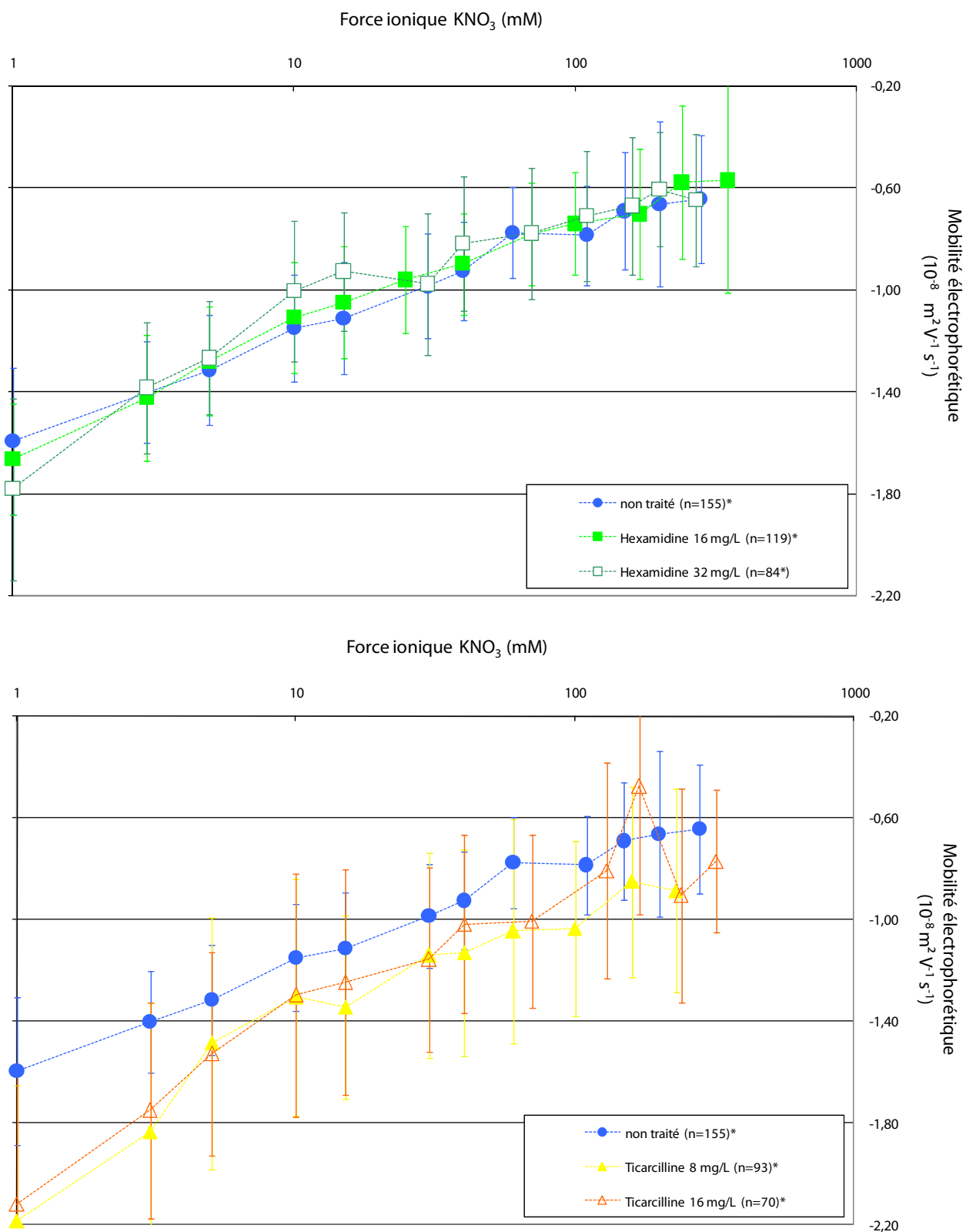


Figure 88 : Courbes obtenues pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 après traitement par

(A) : hexamidine ; (B) : ticarcilline ; (C) : mCx1 ; (D) : Cx1.

Les écarts types représentés sur le graphique sont le reflet de la distribution obtenue sur l'histogramme de répartition des bactéries en fonction de leur mobilité.

ionique), ceux des bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *E. faecalis*) sont nettement plus linéaires, particulièrement pour *E. faecalis*. Cette tendance suggère une perméabilité (caractère mou) des parois plus importante pour les bactéries à Gram négatif en accord avec la structure de leur paroi, comme suggéré par d'autres auteurs [Sonohara et al., 1995].

Les résultats obtenus en microélectrophorèse démontrent tout d'abord que cette technique présente une sensibilité suffisante pour différencier, grâce à leurs propriétés de surface, les 4 souches étudiées. Ainsi pour les souches non traitées, nous avons montré que *E. faecalis* se distingue des 3 autres souches, avec une mobilité électrophorétique moyenne de $-2,8.10^{-8}$ m²/V/s à une force ionique de 10^{-3} mol/L, contre environ $-2,1.10^{-8}$ m²/V/s pour les autres souches. Cette sensibilité a déjà été décrite, pour la distinction de *E. coli* et *S. aureus* par exemple [Sonohara et al., 1995]. Dans cette étude, Sonohara et coll. ont montré que *E. coli* a une surface plus rigide et plus chargée négativement que *S. aureus*, ce que nous ne retrouvons pas dans notre étude (la mobilité des deux espèces étant similaire), la nature des souches utilisées n'étant pas précisées et les conditions expérimentales étant différentes (culture sur gélose trypticase-soja, tampon de suspension des bactéries, appareillage (Kem System 3000, Pen Kem Inc, New York USA)...).

IV.1.2. Résultats obtenus pour *P. aeruginosa* ATCC 27853

Figures 87 et 88 sont présentées les courbes obtenues pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 traitée par hexamidine (16 et 32 mg/L), ticarcilline (8 et 16 mg/L) mCx1 (256 et 512 mg/L), Cx1 (16 et 32 mg/L), comparées au témoin non traité.

Trois comportements différents sont observés (détaillés, avec écart-types, Figure 87) :

- (i) aucune modification de la mobilité électrophorétique moyenne n'est obtenue pour l'hexamidine et le mCx1, quelque soit la concentration testée.
- (ii) dès les faibles forces ioniques, une diminution significative de la mobilité est observée avec le Cx1 ; on obtient ainsi une mobilité de $-1,04.10^{-8}$ m²/V/s et $-0,61.10^{-8}$ m²/V/s respectivement pour les concentrations de 16 et 32 mg/L testées, contre $-1,58.10^{-8}$ m²/V/s pour le témoin non traité, à une force ionique de 10^{-3} mol/L. Un plateau (pour lequel la

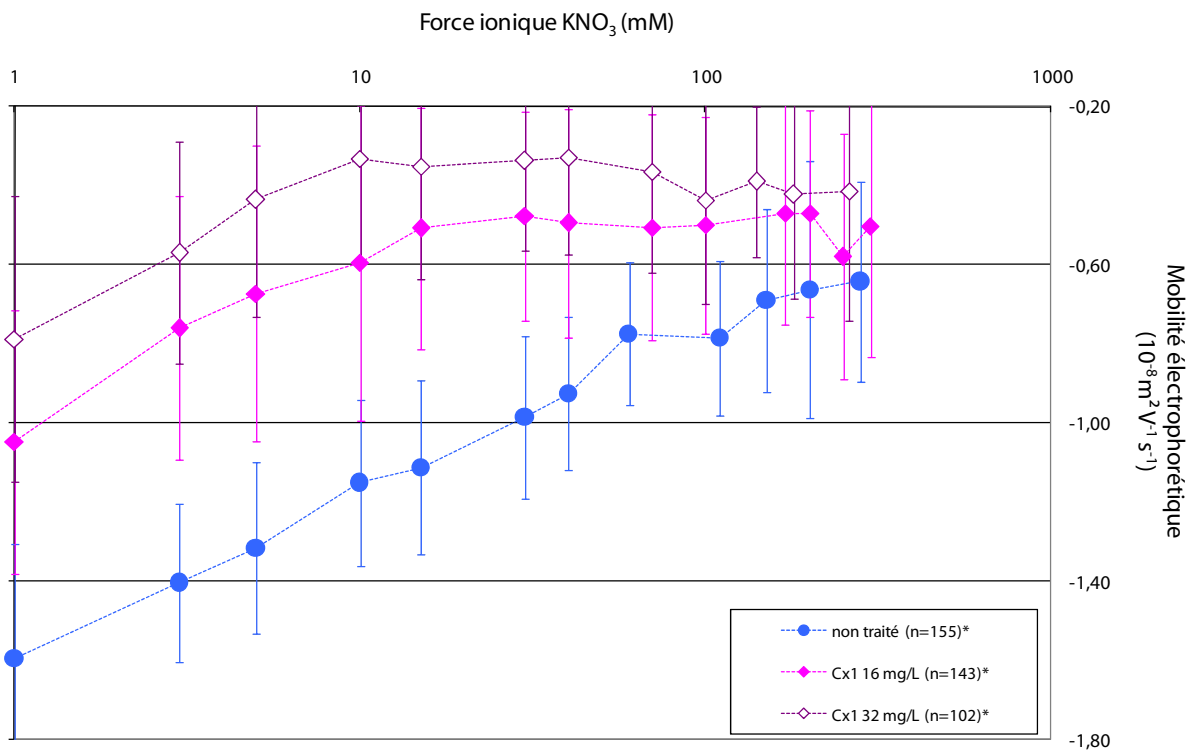
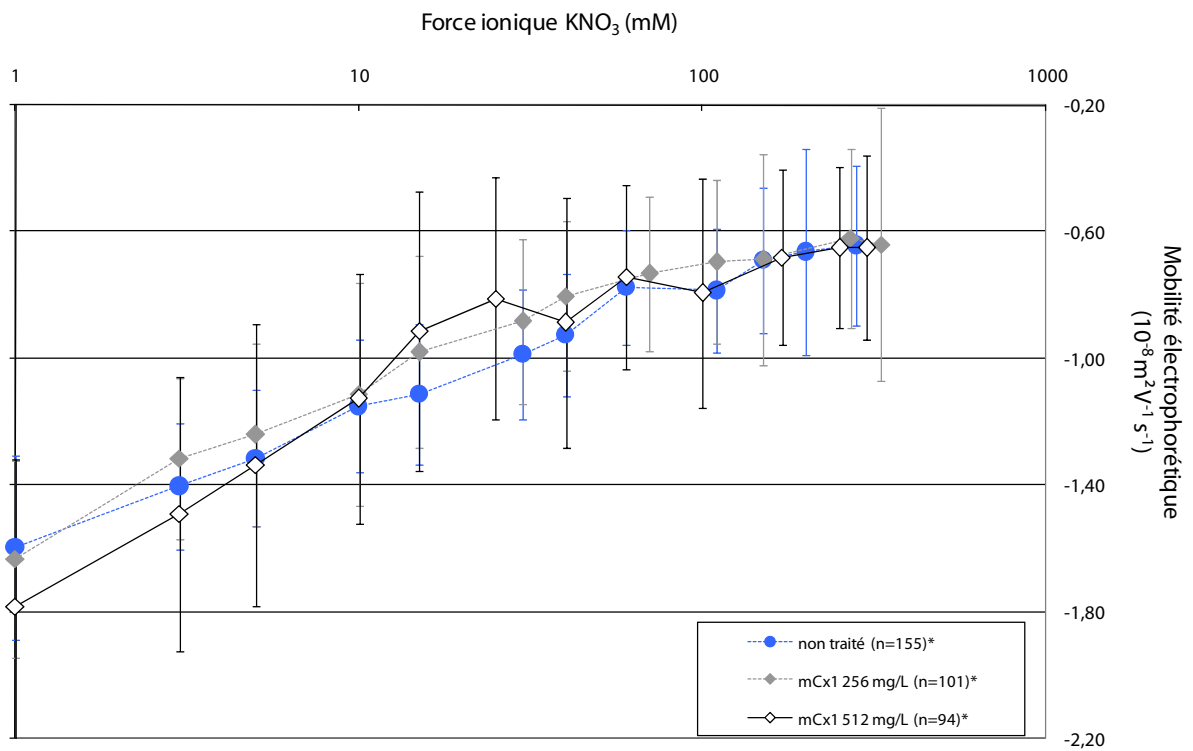


Figure 88 (suite) : Courbes obtenues pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 après traitement par

(A) : hexamidine ; (B) : ticarcilline ; (C) : mCx1 ; (D) : Cx1.

Les écarts types représentés sur le graphique sont le reflet de la distribution obtenue sur l'histogramme de répartition des bactéries en fonction de leur mobilité.

mobilité reste constante quelque soit la force ionique) est rapidement atteint (à partir d'environ 30 mM).

Cet effet traduit une augmentation très significative du caractère perméable des parois en présence de cette molécule et/ou une adsorption spécifique des calixarènes à la surface des bactéries.

- (iii) pour les faibles forces ioniques, une augmentation significative de la mobilité est observée avec la ticarcilline. Cela traduirait une baisse du caractère perméable de la paroi.

De façon intéressante, nous avons suivi l'aspect macroscopique des bouillons après 24 h de croissance en présence des différentes molécules, ainsi que l'aspect « microscopique », dans la cellule de mesure du Zetaphorémètre avant capture des images. Nous avons ainsi pu constater :

- (i) pour le Cx1 : obtention d'un trouble homogène des bouillons, assez semblable à celui du témoin, ainsi qu'une production importante de pigment pyocyanique. Au niveau de la cellule de mesure, les bactéries semblaient augmentées de volume, et étaient réunies sous formes d'agrégats ;
- (ii) pour la ticarcilline, l'hexamidine et le mCx1 : absence totale de production de pigment pyocyanique, avec présence de nombreux agrégats bactériens pour la ticarcilline et l'hexamidine. Au niveau de la cellule de mesure, une augmentation de la taille des bactéries et la formation d'agrégats étaient observés pour la ticarcilline ; pour les autres molécules, rien à signaler.

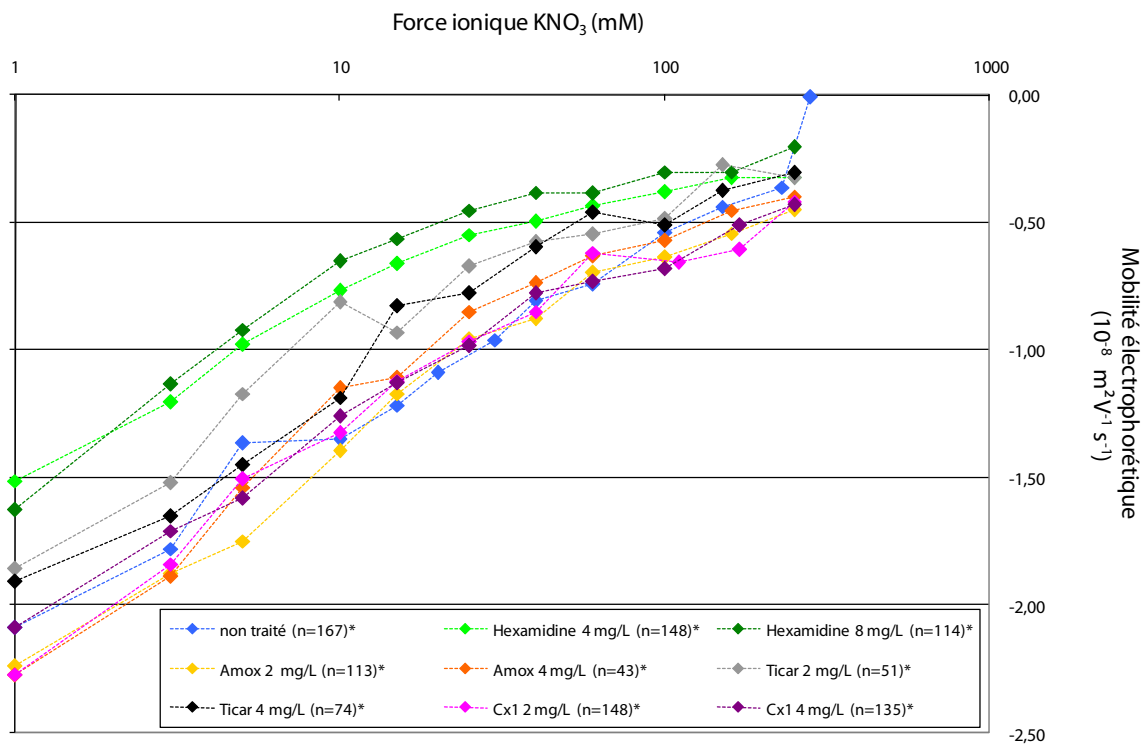


Figure 89 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique. Courbes obtenues pour *E. coli* ATCC 25922 avant et après traitement. Les résultats sont exprimés en mobilité moyenne, calculée sur 3 ou 4 expériences.*nombre moyen de bactéries observées.

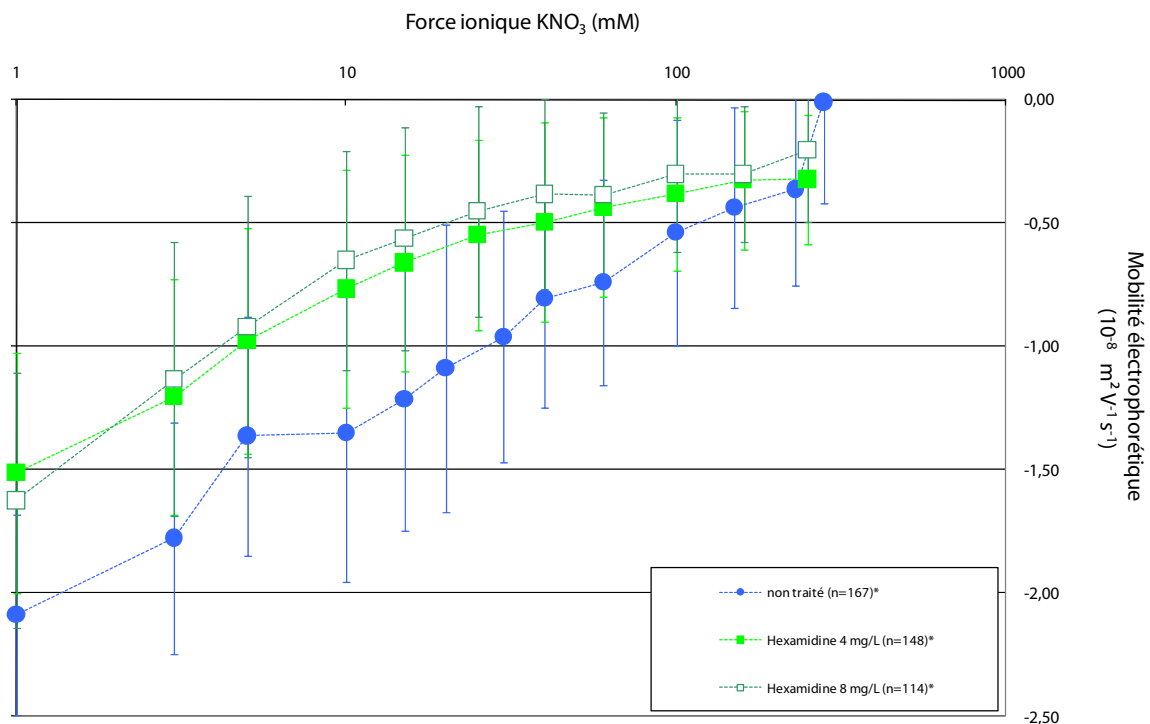


Figure 90 : Courbes obtenues pour *E. coli* ATCC 25922 après traitement par l'hexamidine. Les écarts types représentés sur le graphique sont le reflet de la distribution obtenue sur l'histogramme de répartition des bactéries en fonction de leur mobilité.

IV.1.3. Résultats obtenus pour *E. coli* ATCC 25922

Figure 89 sont présentées les courbes obtenues pour *E. coli* ATCC 25922 traitée par hexamidine (4 et 8 mg/L), amoxicilline (2 et 4 mg/L), ticarcilline (2 et 4 mg/L), mCx1 (256 et 512 mg/L), Cx1 (2 et 4 mg/L), comparées au témoin non traité. Deux comportements différents sont observés (seules seront détaillées les courbes obtenues avec l'hexamidine, avec écart-types, Figure 90) :

- (i) aucune modification de la mobilité électrophorétique moyenne n'est obtenue pour l'amoxicilline, la ticarcilline, le mCx1 ou le Cx1, quelque soit la concentration testée.

Il semble donc que l'effet observé sur *P. aeruginosa* à l'origine (potentielle) de l'activité du Cx1, ne soit pas observable, à cette échelle, sur *E. coli* ATCC 25922. La microélectrophorèse ne nous permet pas de mettre en évidence, dans ce cas, d'atteinte de la paroi bactérienne (pas d'augmentation du caractère perméable, pas d'adsorption du Cx1).

- (ii) dès les faibles forces ioniques, une diminution significative de la mobilité est observée avec l'hexamidine, de façon cependant atténuée par comparaison à ce que nous avons obtenu pour *P. aeruginosa* et Cx1. Ainsi, on obtient ainsi une mobilité de $-1,51 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ et $-1,63 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ respectivement pour les concentrations de 4 et 8 mg/L testées, contre $-2,09 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ pour le témoin non traité, à une force ionique de 10^{-3} mol/L . Un plateau (pour lequel la mobilité reste constante quelque soit la force ionique) est atteint plus rapidement qu'avec le témoin (à partir d'environ 50 mM) (Figure 90).

Cet effet semblerait traduire une augmentation du caractère perméable des parois en présence d'hexamidine, ce qui n'avait jamais été décrit jusqu'alors, mais ne paraît pas reproductible d'une souche à une autre (aucun effet sur *P. aeruginosa*).

De même que pour *P. aeruginosa*, des observations macroscopiques et microscopiques ont été réalisées. Au niveau de l'aspect des bouillons, le trouble était toujours homogène, sans formation d'agrégats, ni de filaments. Au niveau de la cellule de mesure du Zétaphorémètre, la population témoin apparaît très hétérogène au départ (aspect de double pic), puis cet effet s'atténue avec l'augmentation de la force ionique (à partir de 50 mM). Cette hétérogénéité très importante de la population de *E. coli* ATCC 25922, est visible au niveau des écart-types obtenus pour les mobilité

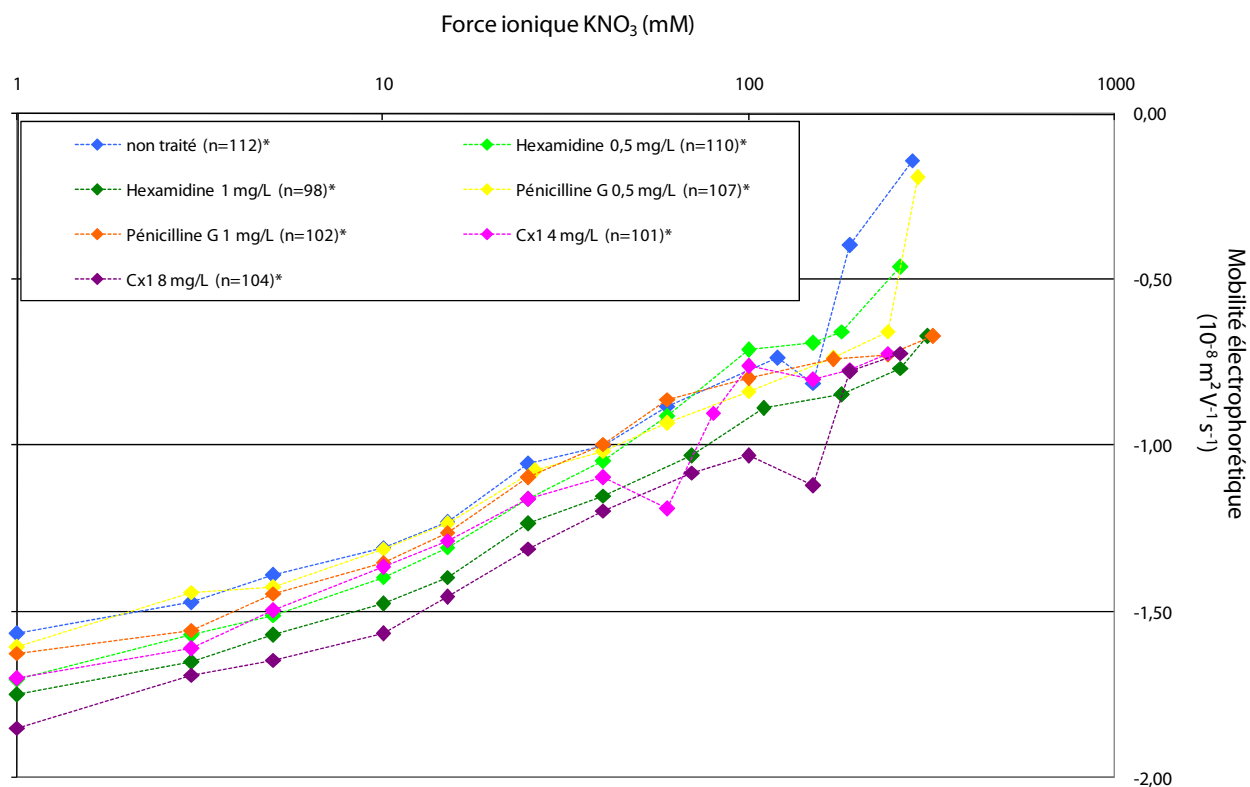


Figure 91 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique. Courbes obtenues pour *S. aureus* ATCC 29213 avant et après traitement. Les résultats sont exprimés en mobilité moyenne, calculée sur 3 ou 4 expériences. *nombre moyen de bactéries observées.

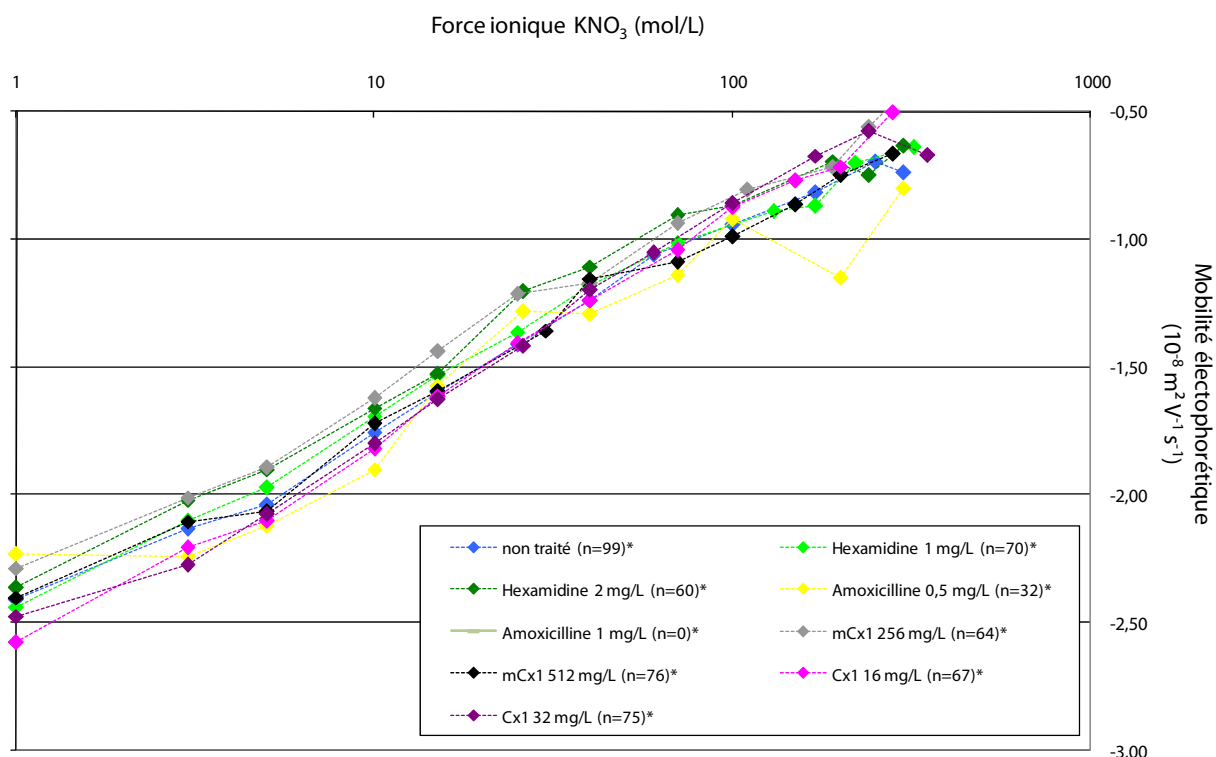


Figure 92 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique. Courbes obtenues pour *E. faecalis* ATCC 29212 avant et après traitement. Les résultats sont exprimés en mobilité moyenne, calculée sur 3 ou 4 expériences. *nombre moyen de bactéries observées.

moyenne (le double de ceux obtenus avec les autres bactéries). Pour l'hexamidine et le Cx1, les pics de distribution de la population en fonction de la mobilité étaient beaucoup plus fins (homogénéisation de la population), avec un aspect assez homogène dans la cellule de mesure. Pour l'amoxicilline, mais de façon encore plus marquée pour la ticarcilline, les bactéries apparaissaient sous forme d'amas ou de « petites chenilles », avec une forme plus allongée que le témoin. Une hétérogénéité très importante de la population était visible avec l'amoxicilline : pic à base très large.

IV.1.4. Résultats obtenus pour *S. aureus* ATCC 29213

Figure 91 sont présentées les courbes obtenues pour *S. aureus* ATCC 29213 traitée par hexamidine (0,5 et 1 mg/L), pénicilline G (0,5 et 1 mg/L), Cx1 (4 et 8 mg/L), comparées au témoin non traité. Aucune modification de la mobilité électrophorétique moyenne n'est obtenue pour l'amoxicilline, quelque soit la molécule et la concentration testées. Les courbes sont quasiment superposables, les écart-types minimes, reflète d'une population très homogène.

Il semble donc que l'effet observé sur *P. aeruginosa* à l'origine (potentielle) de l'activité du Cx1, ne soit pas observable, à cette échelle, sur *S. aureus* ATCC 29213. La microélectrophorèse ne nous permet pas de mettre en évidence, dans ce cas, d'atteinte de la paroi bactérienne, quelque soit la molécule testée.

IV.1.5. Résultats obtenus pour *E. faecalis* ATCC 29212

Figure 92 sont présentées les courbes obtenues pour *E. faecalis* ATCC 29212 traitée par hexamidine (1 et 2 mg/L), amoxicilline (0,5 mg/L), mCx1 (256 et 512 mg/L), Cx1 (16 et 32 µg/mL), comparées au témoin non traité. Aucune modification de la mobilité électrophorétique moyenne n'est obtenue quelque soit la molécule et la concentration testées.

Il semble donc que l'effet observé sur *P. aeruginosa* à l'origine (potentielle) de l'activité du Cx1, ne soit pas observable, à cette échelle, sur *E. faecalis* ATCC 29212. La microélectrophorèse ne nous permet pas de mettre en évidence, dans ce cas, d'atteinte de la paroi bactérienne, quelque soit la molécule testée.

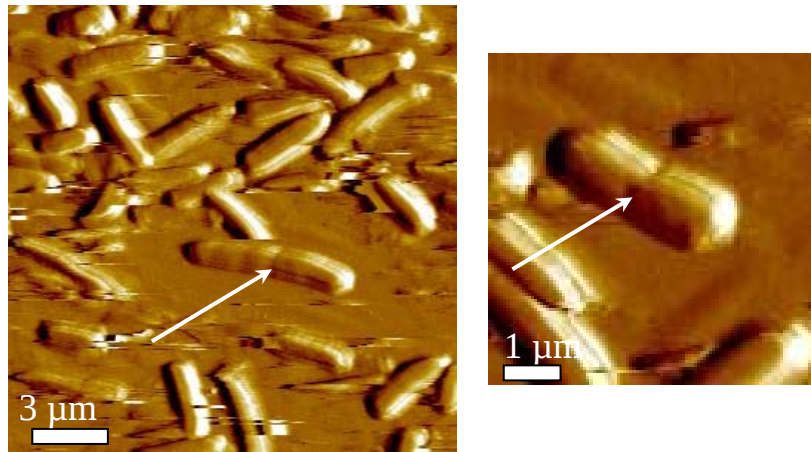


Figure 93 : Images AFM en mode contact d'*E. coli* ATCC 25922 non traitée.

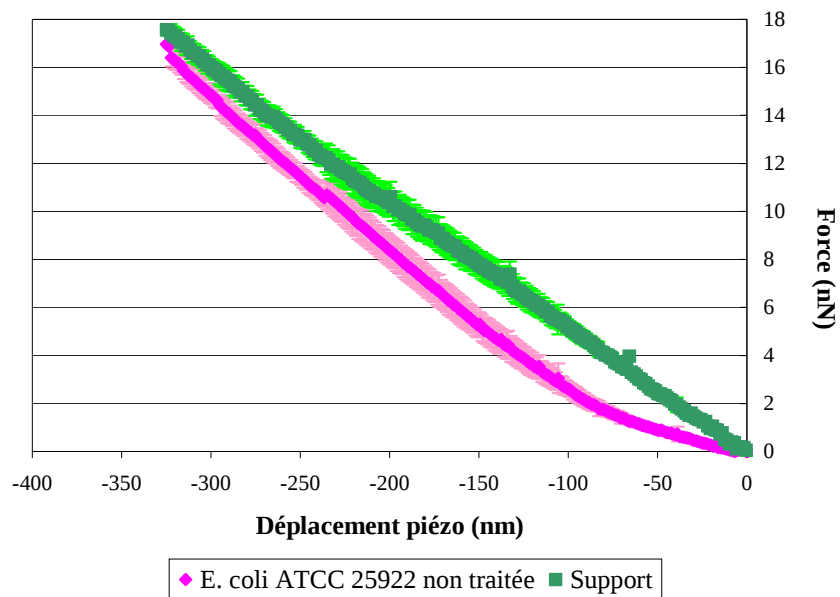


Figure 94 : Courbe de force obtenue pour *E. coli* ATCC 25922 non traitée en comparaison à celle obtenue pour le support (lame de verre + PEI).

IV.2. Résultats obtenus en microscopie à force atomique

Les résultats présentés ici concernant la microscopie à force atomique (AFM) ne sont que ceux d'une étude préliminaire, et n'ont pas pu être l'objet de confirmation sur d'autres expériences. Ces résultats sont donc à considérer comme une 1^{ère} approche de ce que peut donner l'étude de l'effet pariétal de molécules antibactériennes par cet outil innovant.

Les bactéries sont fixées sur une lame recouverte de PEI. Nous avons souhaité, en préambule à cette étude, évaluer la toxicité éventuelle du PEI afin d'éliminer d'éventuels artefacts. Cette toxicité a été déterminée par la réalisation des CMI par méthode de microdilution en milieu liquide, adaptée à la texture visqueuse du PEI : les plaques étaient pré-coatées avec différentes concentrations de PEI (0,0125% à 6,4%) pendant 24 h à 35°C, puis la technique classique en milieu MHB était réalisée. Aucune toxicité (CMI > 6,4%) n'a été observée sur les quatre souches testées (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853) (données non présentées).

IV.2.1. *E. coli* ATCC 25922 non traitée

Les images présentées Figure 93 montrent des bacilles de longueur 2 à 7 µm environ, de largeur 0,5 à 1 µm et d'épaisseur environ 0,5 µm. Il est cependant à noter que les mesures sont effectuées en mode contact : on appuie sur la bactérie, l'épaisseur mesurée est donc sous-estimée [Velegol & Logan, 2002]. L'aspect de ces bacilles est assez homogène, leur taille plus variable. Certains sont en cours de division (flèches).

Une comparaison des courbes de force obtenues sur le support (lame de verre recouverte de PEI) et sur la bactérie non traitée a été réalisée. La Figure 94 montre une relation linéaire caractérisant les forces s'exerçant entre le support et la pointe de l'AFM (■). La courbe de force obtenue sur *E. coli* non traitée (◆) offre, quant à elle, deux phases caractéristiques, précédemment décrites [Dufrêne, 2002] :

- (i) une phase dite non linéaire, pour les faibles forces. Cette phase correspond à la pénétration de la pointe dans les couches externes de la paroi bactérienne, et est caractéristique de son l'élasticité (module de Young (E)) ; l'élasticité dépend à la fois de l'épaisseur et de la

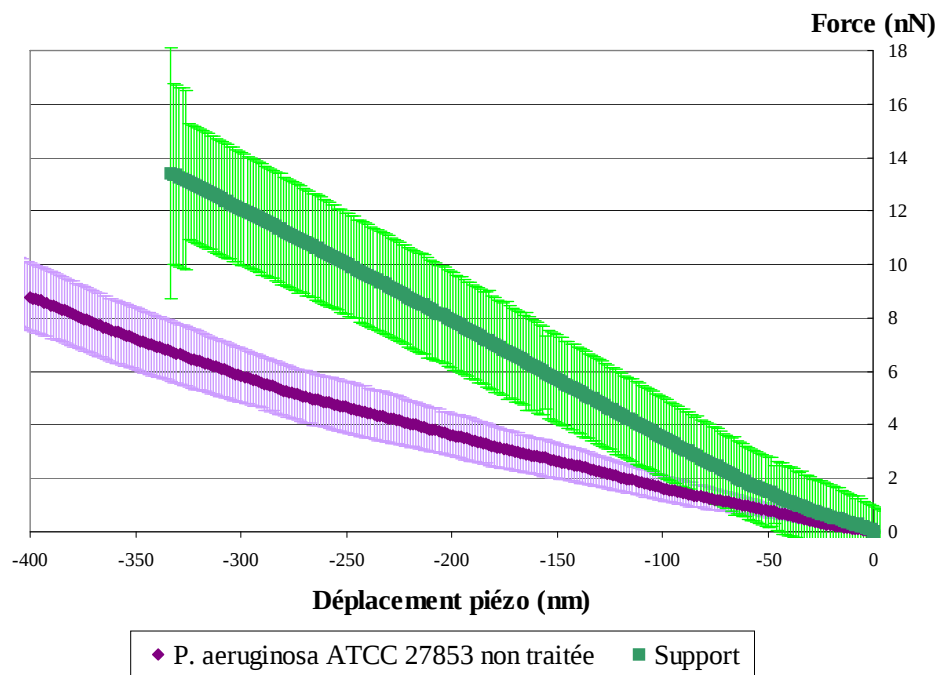


Figure 95 : Courbe de force obtenue pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 non traitée en comparaison à celle obtenue pour le support (lame de verre + PEI).

composition de la paroi, et de la nature des groupements présents. Plus le module de Young est élevé, plus la bactérie est rigide.

- (ii) une phase dite linéaire, pour les forces plus importantes, dépendante de la constante de raideur du levier (k_c) et la constante de raideur de la bactérie (k_B). Au cours de cette phase, le levier subit une déformation linéaire qui est en relation avec la pression osmotique interne de la bactérie.

Ces deux phases peuvent être considérées comme le reflet de l'ultrastructure de la paroi bactérienne. Ainsi, il a déjà été démontré dans la littérature que, (i) la phase non linéaire correspond à une compression progressive des structures externes de la paroi, (ii) la phase linéaire, quant à elle, est induite par une compression progressive de la membrane plasmique, maintenue par la pression osmotique interne [Arnoldi et al., 1998 ; Arnoldi et al., 2000].

IV.2.2. *P. aeruginosa* ATCC 27853 non traitée

Les images présentées Figure 97A (page 177) montrent des petits bacilles, un peu trapus, d'aspect assez homogène : 2 à 3 μm de long, 1 μm de large et épaisseur 0,5 μm environ.

Une comparaison des courbes de force obtenues sur le support (lame de verre recouverte de PEI) et sur la bactérie non traitée a été réalisée. De même que précédemment, la Figure 95 montre une relation linéaire caractérisant les forces s'exerçant entre le support et la pointe de l'AFM (■).

La courbe de force obtenue sur *P. aeruginosa* non traitée (◆) offre deux phases caractéristiques, tout comme ce qui a été obtenu avec *E. coli* non traitée :

- (i) une phase dite non linéaire, pour les faibles forces
- (ii) une phase dite linéaire, pour les forces plus importantes

On constate des différences significatives entre les courbes de force réalisées sur les supports incubés avec *E. coli* ou *P. aeruginosa*. Une des difficultés dans ce genre d'expérience est de comparer les différents résultats. En effet, l'étape d'incubation peut conduire à une adhésion non négligeable de résidus organiques et/ou de produits issus de lyses bactériennes sur la lame de verre

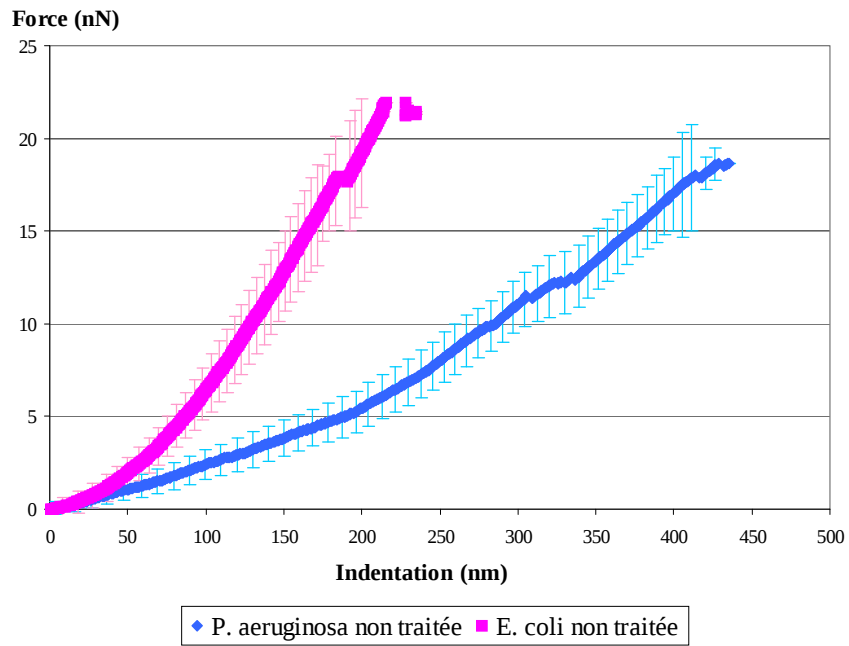


Figure 96 : Comparaison des courbes d'indentation obtenues pour *E. coli* ATCC 25922 non traitée et *P. aeruginosa* ATCC 27853 non traitée. Pour chacune des souches testées, les courbes de force ont été déterminées sur 5 bactéries, à raison de 5 courbes par bactérie en moyenne ; la courbe présentée est une courbe moyenne.

préalablement recouverte de PEI. De plus, cet effet est probablement différent suivant les souches bactériennes et les conditions physico-chimiques. Enfin, des expériences très récentes viennent de montrer que la localisation spatiale des courbes de force sur le sommet des bactéries requiert une résolution de l'ordre de la cinquantaine de nanomètres correspondant aux limites de l'appareil actuel (forte hystérèse des piezo-électriques impliquant un décalage entre l'image et la localisation de la courbe de forces). Une des manières d'éviter cet aspect serait de réaliser des courbes forces-volume (Images 2D des courbes de force) et ainsi reconstruire les courbes effectivement au sommet des bactéries. Cette analyse sera envisagée de manière à confirmer ces premiers résultats qualitatifs.

Afin d'apprécier les caractéristiques nanomécaniques des cellules, les courbes de force sont transformées en courbes force-indentation par soustraction de la contribution du levier (cf. partie expérimentale).

La Figure 96 présente les courbes d'indentation obtenues pour *E. coli* et *P. aeruginosa* non traitées. Ces deux courbes, d'aspect général similaire, sont cependant clairement distinctes, avec, qualitativement, une élasticité plus grande de *P. aeruginosa*, et une pente de la partie linéaire plus importante pour *E. coli*. Cela signifie que *E. coli* présente une rigidité supérieure à celle de *P. aeruginosa* ; ces résultats restant à confirmer. Ainsi, ces deux bactéries non traitées semblent pouvoir être différenciées par leur courbe d'indentation.

IV.2.3. *P. aeruginosa* ATCC 27853 après 24 h d'exposition à l'hexamidine, au mCx1 et au Cx1

Les images présentées Figure 97 permettent d'appréhender d'infimes changements dans l'aspect de la paroi de la bactérie. Figures A₂ et C₂ sont présentées des bactéries tronquées (flèches), cela est peut être dû à un décollement de la bactérie lors du balayage de la surface par la pointe nanométrique.

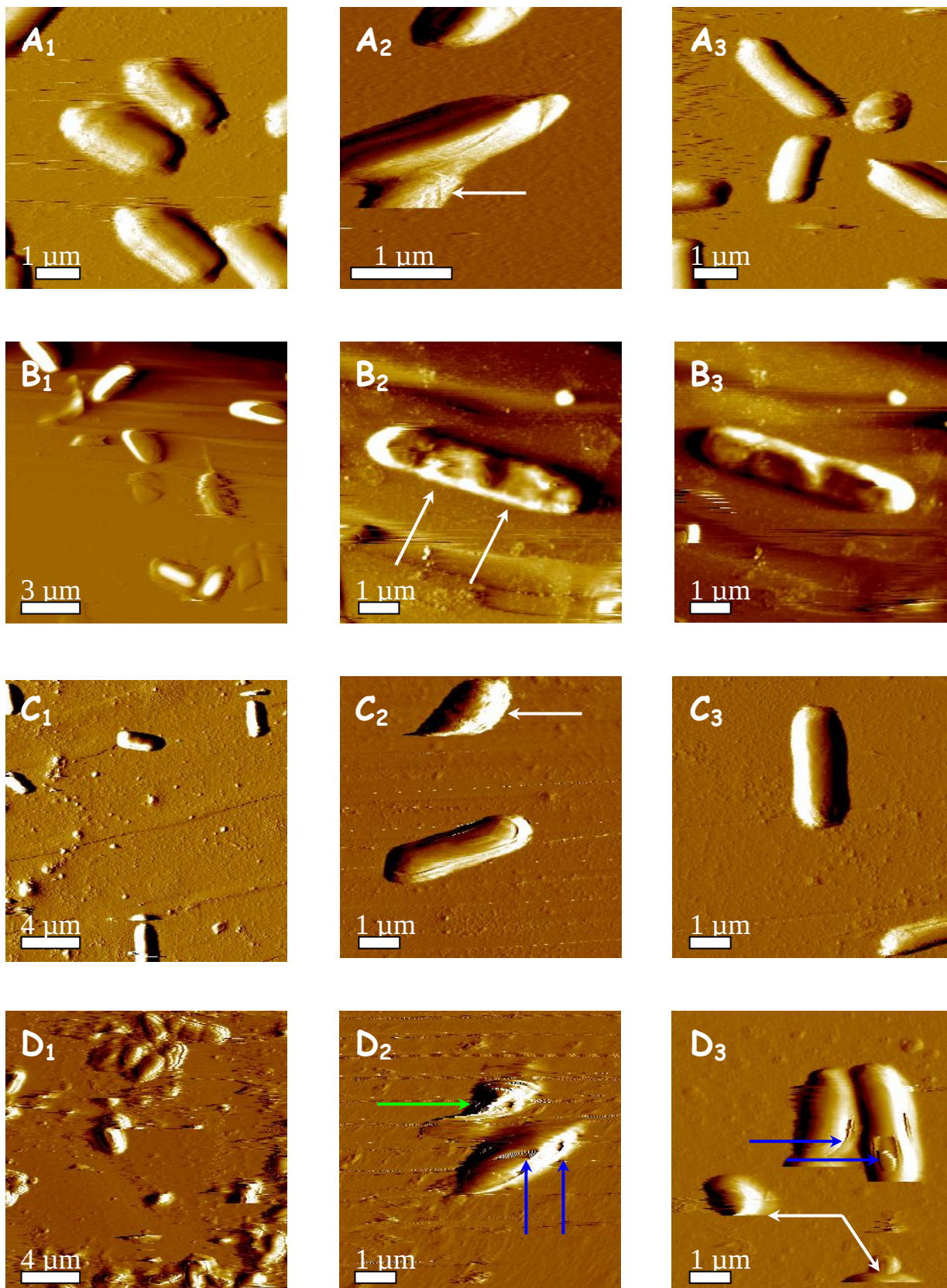


Figure 97 : Images en mode contact obtenues pour *P. aeruginosa* ATCC 27853.

A_{1,2,3} : non traité ; B_{1,2,3} : hexamidine 32 μg/mL ; C_{1,2,3} : mCx1 512 μg/mL ; D_{1,2,3} : Cx1 32 μg/mL

(i) Hexamidine (Figure 97B) :

Par comparaison au témoin non traité (A), le traitement par l'hexamidine semble entraîner un « aplatissement » de la surface des bactéries (Figure B₁). La courbe de suivi du balayage de la surface nous a permis en effet d'observer une surface plane au lieu de la surface bombée observée chez les bactéries non traitées. Un zoom plus précis sur une seule bactérie (Figures B₂, B₃) montre une surface plus rugueuse, avec une succession de déformations (Figure B₂, flèches).

(ii) mCx1 (Figure 97C) :

Aucune modification majeure n'est visible lors du traitement par mCx1 à la concentration de 512 mg/L. On observe ainsi, Figure C₃, de petits bacilles aux dimensions similaires à celles des bactéries témoins non traitées (Figure A₃), et à la surface lisse.

(iii) Cx1 (Figure 97D) :

Le traitement par Cx1 à la concentration de 32 mg/L semble entraîner diverses modifications des propriétés de surface. Il est tout d'abord à noter que nous avons observé une sensibilité accrue des bactéries au passage de la pointe ; en effet, celles-ci semblaient moins bien adhérer et étaient facilement emportées lors du balayage de la pointe (Figure D₃, flèches blanches). Par ailleurs, les images réalisées par un zoom précis sur quelques bactéries ont permis de remarquer l'existence de « brèches » dans la membrane des bactéries traitées (Figures D₂ et D₃, flèches bleues) ; ainsi, on a pu observer soit des creux, soit des endroits où des « lambeaux de membrane » se décollent de la surface bactérienne (Figure D₃). Certaines bactéries sont amputées d'une partie de leur corps bactérien ou déformées (Figure D₂, flèche verte).

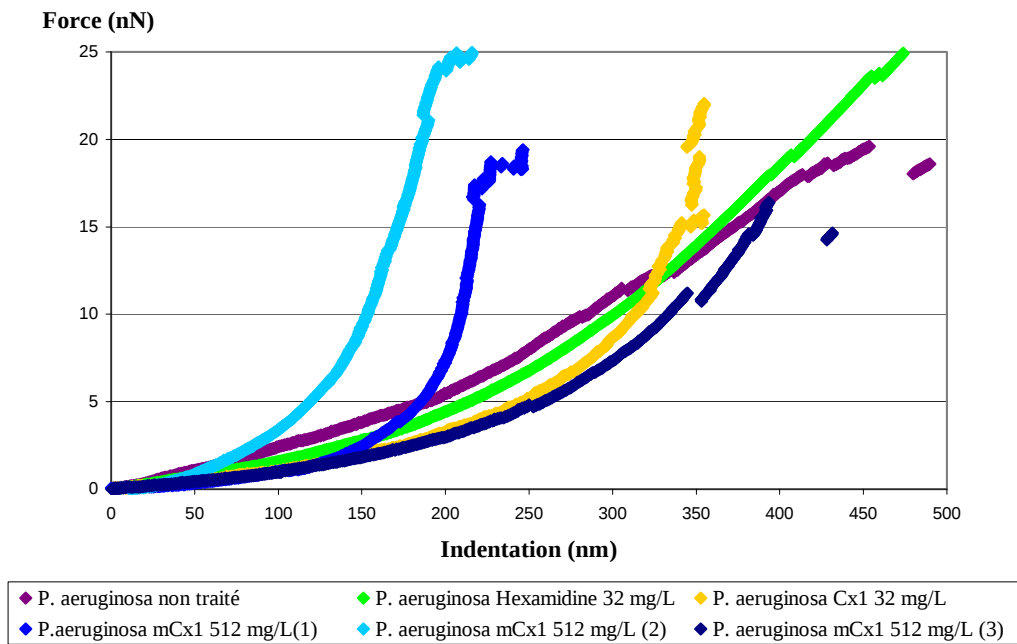


Figure 98 : Comparaison des courbes d'indentation obtenues pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 non traité et après 24 h de contact avec hexamidine (32 mg/L), mCx1 (512 mg/L) et Cx1 (32 mg/L). Pour chacune des conditions testées, les courbes de force ont été déterminées sur 5 bactéries, à raison de 5 courbes par bactérie en moyenne.

Les courbes d'indentation (Figure 98), obtenues à partir de *P. aeruginosa* ATCC 27853 ayant subi les différents traitements, ont permis d'apporter des informations complémentaires aux observations réalisées sur les images en mode contact, et en milieu liquide.

(i) Hexamidine (◆)

Après 24 h d'exposition, aucune modification des interactions entre la pointe et la bactérie ne semble perceptible sur la courbe d'indentation. Cela laisserait supposer que le traitement par l'hexamidine, à la concentration de 32 mg/L, n'entraîne aucun changement majeur de l'ultrastructure des couches externes de la paroi ou de la pression osmotique interne.

(ii) mCx1 (◆, ◆, ◆)

De façon très intéressante, plusieurs comportements ont été obtenus après 24 h de contact avec mCx1 à la concentration de 512 mg/L. Alors qu'aucun changement n'était visible sur les images, trois profils différents de courbe d'indentation sont apparus : les profils (1) (◆) et (2) (◆) significativement différents du profil témoin (◆), avec une pente très importante de la partie linéaire, le profil (3) (◆) étant plus proche de celui obtenu avec les bactéries non traitées ou après 24 h d'exposition à l'hexamidine. Cela laisserait supposer que le traitement par mCx1 entraîne une atteinte graduelle de *P. aeruginosa*, avec une augmentation de la rigidité et de la pression osmotique interne.

(iii) Cx1 (◆)

La courbe d'indentation, obtenue après 24 h de contact avec Cx1 à la concentration de 32 mg/L, est significativement différente de la courbe témoin non traité. La partie initiale est très similaire à celle de la courbe (3) obtenue après exposition au mCx1, la pente de la courbe étant ensuite plus importante. L'effet du Cx1 semble donc comparable à celui du mCx1, avec une augmentation de la rigidité de la bactérie, sans toutefois présenter un effet graduel.

V. DISCUSSION

Après 24 h d'exposition aux différentes molécules, aucune modification de la mobilité électrophorétique moyenne n'a été obtenue dans nos conditions expérimentales, pour les deux souches de cocci à Gram + testées : *S. aureus* ATCC 29213 & *E. faecalis* ATCC 29212. Il semblerait donc que les propriétés de paroi des bactéries à Gram + et/ou que la sensibilité de la technique de microélectrophorèse, ne soient pas adaptées à la mise en évidence d'altérations pariétales après traitement par une molécule antibactérienne.

En revanche, divers changements ont été constatés lors du traitement par l'hexamidine sur *E. coli* ATCC 25922 et par la ticarcilline et le Cx1 sur *P. aeruginosa* ATCC 27853. Une diminution significative de la mobilité a été observée pour *P. aeruginosa* en présence de Cx1 et pour *E. coli* en présence d'hexamidine. Cet effet traduit une augmentation très significative du caractère perméable des parois en présence de cette molécule, et/ou une adsorption spécifique du calixarène sur les sites chargés négativement de la paroi. La légère augmentation de mobilité obtenue pour *P. aeruginosa* en présence de ticarcilline, aux basses forces ioniques, est reproductible. Cela pourrait indiquer qualitativement une diminution "légère" de la perméabilité de la paroi.

Cependant, même si elle apporte des indications sur les propriétés de surface, la microélectrophorèse ne permet cependant pas de statuer sur l'origine d'une modification, ni sur la part d'implication de chacun de paramètres pouvant être en cause. Les analyses théoriques des différents profils obtenus sont une des perspectives de ce travail : quantification respectivement de la densité de charge (ρ_0) et du caractère « mou » des couches les plus externes de l'enveloppe, de manière à distinguer les effets de sorption de ceux conduisant à la perte/augmentation du caractère « mou/dur » des parois, avant et après stimulation. Notre étude nous a permis d'évaluer la capacité de la microélectrophorèse à évaluer des modifications consécutives à un traitement des bactéries ; des incertitudes persistent quant à la sensibilité de cette technique appliquée à ce type d'évaluation.

L'évolution obtenue pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 indique l'importance de la perméabilité des parois dans les mécanismes d'action de composés antibactériens. Ces différents résultats démontrent la spécificité des molécules en relation avec les caractéristiques électrophorétiques différentes des souches testées, conduisant à des effets plus ou moins marqués suivant la nature et la structure des parois.

L'AFM nous a apporté des informations complémentaires à celles obtenues en microélectrophorèse, grâce aux images obtenues en mode contact mais aussi à la spectroscopie de force. Ainsi, les expériences menées sur *E. coli* et *P. aeruginosa* nous ont permis de montrer que les courbes d'indentation permettent de distinguer les deux souches non traitées, *E. coli* apparaissant plus rigide. Cette donnée est en accord avec les valeurs de k_b rapportées dans de précédentes études : 0,04 N/m pour *E. coli* et 0,02 N/m pour *P. aeruginosa* [Yao et al., 2002 ; Vadillo-Rodriguez et al., 2004]. L'évaluation de l'effet de l'hexamidine, du mCx1 et du Cx1 a ensuite été réalisée sur *P. aeruginosa*. Les images obtenues en mode contact nous ont permis d'appréhender des altérations de la paroi bactérienne après 24 h d'exposition à l'hexamidine et au Cx1. Les courbes d'indentation ont montré une augmentation de la rigidité des bactéries suite au traitement par mCx1 et Cx1. La détermination des valeurs des constantes de raideur des bactéries k_b et du module de Young (E) est une des perspectives logique de ce travail, après confirmation des profils de courbes de force obtenus, par répétition des essais menés ici.

Ces différents résultats obtenus par AFM semblent confirmer le changement de propriétés de surface obtenus par microélectrophorèse, particulièrement au moment où les images ont été enregistrées (diminution de l'adhésion en présence de Cx1). Toutefois, il est très difficile de quantifier des forces de cisaillement. Les premiers résultats obtenus par spectroscopie de force démontrent une variabilité importante des courbes en fonction de la souche mais aussi au sein d'une même espèce. Cette tendance est probablement en relation avec les problèmes de résolution spatiale indiqués précédemment. Des expériences complémentaires devront être réalisées afin de différencier ces effets.

Des divergences ont été aussi observées entre les images et les courbes de force. Ainsi, alors que le traitement par l'hexamidine semblait entraîner un aplanissement des bactéries, aucune modification n'a été obtenue sur les courbes de force. Inversement, alors qu'aucune altération n'était visible sur les images après exposition au mCx1, une augmentation de la rigidité apparaissait sur les courbes d'indentation. Ces différences peuvent être liées (i) au fait que les images sont uniquement reconstituées, à partir des déflexions du levier, et donc pas toujours d'une qualité suffisante, (ii) que le balayage de la pointe peut entraîner des altérations, considérées à tort comme dues au traitement.

Au cours de nos expérimentations, nous nous sommes par ailleurs heurtés au problème d'adhésion des bactéries sur les lames de verre recouvertes de PEI : soit les bactéries n'adhéraient pas du tout, soit l'adhésion était trop faible et les bactéries étaient emportées lors du balayage par la pointe. Trois souches non traitées ont été testées dans un premier temps : *E. coli*, *E. faecalis* et *P. aeruginosa*.

L'adhésion des deux premières était inconstante, nous avons donc poursuivi notre étude sur *P. aeruginosa*. Il est à prendre en compte aussi un éventuel changement des propriétés de surface lié au traitement, et donc une modification de la capacité d'adhésion des bactéries traitées ; c'est ce qui a été observé après 24 h d'exposition au Cx1, avec une augmentation de la sensibilité des bactéries au passage de la pointe. Dans la littérature, diverses surfaces ont été utilisées pour l'adhésion des bactéries : PEI avec *E. coli* [Razatos et al., 1998 ; Ong et al., 1999 ; Li & Logan, 2004], polyL-lysine avec *K. terrigena* [Vadillo-Rodriguez et al., 2004], mica avec *P. aeruginosa* [Touhami et al., 2006], piégeage de *S. aureus* dans une membrane polymérique poreuse [Touhami et al., 2004]... Il serait intéressant, dans le cadre d'expériences futures et complémentaires, d'étudier l'adhésion sur polystyrène et polyL-lysine afin d'améliorer l'adhésion d'*E. coli*.

Cette étude nous a permis de montrer que l'AFM, réalisée en milieu aqueux, en mode spectroscopie de force plutôt qu'en mode image, peut être utilisée pour évaluer l'effet d'un traitement antibactérien sur les propriétés nanomécaniques de surface des bactéries, à une échelle nanométrique.

Microélectrophorèse et microscopie à force atomique : deux nouveaux outils d'évaluation de l'effet pariétal d'antibactériens

Microelectrophoresis and atomic force microscopy: new tools to explore mechanism of action of antibacterial compounds

M. Grare^a, E. Dague^b, M. Mourer^a, J.-B. Regnouf-de-Vains^a, C. Finance^a, J.-F.L. Duval^c,
R.-E. Duval^{a,*}, F. Gaboriaud^{b,*}

^a *Groupe d'étude des vecteurs supramoléculaires du médicament, UMR 7565, CNRS, faculté de pharmacie, Nancy université, 5, rue Albert-Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy cedex, France*

^b *Laboratoire de chimie-physique et microbiologie pour l'environnement, UMR 7564, CNRS, Nancy université, 405, rue de Vandœuvre, 54600 Villers-lès-Nancy, France*

^c *Laboratoire environnement et minéralurgie, UMR 7569, CNRS, Nancy université, 15, avenue du Charmois, BP 40, 54501 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France*

Reçu le 3 juillet 2007 ; accepté le 16 août 2007

Disponible sur internet le 29 octobre 2007

Résumé

Les propriétés de surface bactérienne jouent un rôle prépondérant dans les phénomènes tels que l'adhésion ou la formation de biofilms (sur cathéters ou prothèses par exemple). Comprendre ces phénomènes ainsi que les interactions survenant entre bactéries et antibiotiques reste difficile, du fait de la complexité et de la nature dynamique des constituants de la paroi bactérienne. De nombreuses techniques ont vu le jour ces dernières années, permettant une exploration à différentes échelles : macroscopique, microscopique, voire moléculaire. Deux de ces outils vont être le centre de cette étude : (i) la microélectrophorèse, qui permet une évaluation des propriétés électrohydrodynamiques, par mesure de la mobilité électrophorétique ; et (ii) la microscopie à force atomique (AFM), permettant d'imager les cellules en milieu liquide mais aussi de mesurer les propriétés nanomécaniques des enveloppes bactériennes. Après une brève présentation des principes et instrumentation, nous présenterons les applications possibles de ces deux techniques dans le domaine de la microbiologie, et nous discuterons la place de ces outils dans la détermination des cibles d'action de molécules antibactériennes.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Microbial cell surface properties play a central role in controlling phenomena such as bacterial adhesion and biofilm formation (on stent or on prosthesis for example). The quantification of these properties and the understanding of interactions with antibacterial compounds remain difficult, in view of the complex and dynamic nature of the cell wall constituents. Various approaches, macroscopic, microscopic or molecular, have been developed. Two of them interest us today: (i) microelectrophoresis, which permits to evaluate surface modifications by measuring electrophoretic mobility; and (ii) atomic force microscopy (AFM), a high resolution imaging device, which allows investigations at nanometric scale. After brief presentation of principles and instrumentations, the aim of this article is to present the different applications of these techniques in Microbiology, and to discuss interest of these tools in order to investigate mechanism of action of antibacterial compounds.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Microélectrophorèse ; Microscopie à force atomique ; Antibactériens ; Cible d'action

Keywords: Microelectrophoresis; Atomic force microscopy; Antibacterial compounds; Mechanism of action

* Auteurs correspondants.

Adresses e-mail : raphael.duval@pharma.uhp-nancy.fr (R.-E. Duval), gaboriaud@lcpme.cnrs-nancy.fr (F. Gaboriaud).

1. Introduction

La structure de la paroi des bactéries est complexe et joue un rôle clé dans le contrôle de phénomènes tels que l'adhésion des bactéries et la formation de biofilms (sur des cathéters ou des prothèses par exemple). Explorer les propriétés de surface au niveau macroscopique, microscopique, voire moléculaire, est difficile au vu de la complexité et de la nature dynamique des constituants pariétaux. Diverses approches macroscopiques ont été développées ; elles sont essentiellement fondées sur l'estimation :

- de l'hydrophobicité de surface par mesure d'angle de contact, ou test MATS (*microbial adhesion to solvents*) ;
- de l'efficacité d'adhésion de bactéries à différents substrats ;
- du potentiel zêta par mesure de mobilité électrophorétique (technique de microélectrophorèse).

Même si ces méthodes ont largement contribué à la compréhension des propriétés de surface bactérienne, elles restent limitées et correspondent à des approches considérant les particules biologiques comme des sphères dures et homogènes. Cette limitation a été récemment levée à l'aide d'études théoriques récentes qui permettent de quantifier les propriétés électrohydrodynamiques (densité de charge, perméabilité) tout en considérant le caractère mou et hétérogène des interfaces bactériennes [1]. À l'aide de ces nouveaux outils théoriques, les propriétés électrocinétiques des bactéries peuvent être décrites en relation avec leurs structures de surface (capsule, fibrille, LPS) [2–4].

En parallèle, des techniques de microscopie ont été largement développées ces dernières décennies afin d'étudier la structure des bactéries, et plus particulièrement leurs enveloppes, à des échelles submicroscopiques. La microscopie électronique à transmission a fait l'objet de nombreuses études malgré son caractère fortement agressif vis-à-vis des ultrastructures de surface (ex : capsule, fibrille, LPS, substances extracellulaires...) le plus souvent éliminées par des

méthodes conventionnelles de préparation [5]. Cependant, des méthodes récentes de cryosubstitution permettent de préserver au mieux ces structures mais sont malheureusement très demandeuses en temps de préparation. Malgré ces progrès méthodologiques, ces microscopies électroniques sont limitées à des conditions d'observation *ex situ*. Dans ce contexte, la microscopie à force atomique (AFM : *atomic force microscopy*), découverte par Binnig et al. en 1986 [6], est probablement la méthode la plus adaptée pour étudier les bactéries en milieu aqueux, et ce, avec une résolution de l'ordre du nanomètre par newton. En particulier, cette microscopie permet d'imager et quantifier les propriétés de surface et les interactions à la surface des bactéries.

Nous présenterons ici les caractéristiques générales de deux techniques, la microélectrophorèse et l'AFM, et en nous appuyant sur quelques études récentes, nous montrerons l'intérêt de l'application de telles techniques au domaine de la microbiologie, et plus particulièrement, à l'étude de l'effet de molécules anti-infectieuses sur les parois bactériennes.

2. Microélectrophorèse

2.1. Principe général

Les particules en suspension sont placées dans la chambre de mesure constituée de deux compartiments contenant les électrodes, et d'une cellule de mesure (Fig. 1). Un courant est appliqué entre ces deux électrodes créant ainsi un champ électrique uniforme dans lequel se déplacent les particules chargées : les particules positives se déplacent vers la cathode, et les particules négatives se déplacent vers l'anode.

Lorsque le courant est appliqué, les particules mais aussi le fluide se déplacent dans la chambre de mesure. Ce phénomène d'électro-osmose est caractérisé par un mouvement du fluide dans un sens à la surface de la chambre de mesure, ainsi qu'un retour de flux dans le sens opposé au centre de la chambre de mesure. Il existe une zone où le fluide est considéré stationnaire ; c'est au niveau de ce plan stationnaire que

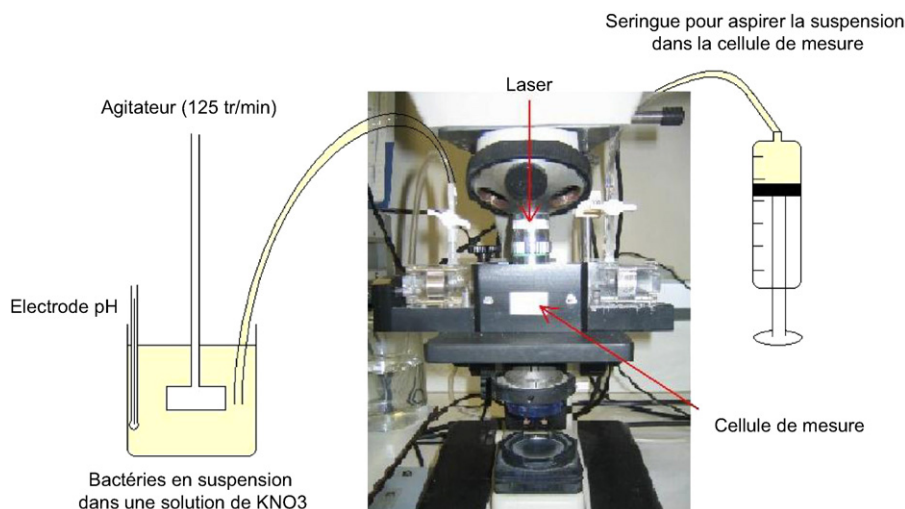


Fig. 1. Schéma simplifié de l'appareillage de microélectrophorèse.

sont réalisées les mesures de mobilité électrophorétique. La mesure est réalisée en illuminant l'échantillon par un laser permettant ainsi de visualiser sur une image optique la réflexion du laser par les cellules. La mobilité électrophorétique est ensuite calculée à partir d'une série d'images enregistrées à plusieurs temps consécutifs à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image. Classiquement, entre 50 et 150 trajectoires correspondant à des cellules individuelles sont mesurées pour une condition physicochimique particulière (pH, force ionique). À partir de ces données, les histogrammes de répartition des mobilités électrophorétiques peuvent être représentés comme illustré sur la Fig. 2. Il faut noter que cette représentation permet d'identifier des comportements hétérogènes au sein d'une même souche, c'est-à-dire plusieurs populations avec des mobilités différentes [7]. En règle générale, une distribution du type gaussien est observée et, les moyennes et écarts types des mobilités électrophorétiques sont calculés à partir de ces données.

Dans le cas de sphère dure, ces mobilités sont directement proportionnelles au potentiel zêta (ζ) des particules à partir de l'équation de Smoluchowski. En aucun cas, cette équation n'est valable pour les systèmes bactériens du fait de leurs caractères mous, hétérogènes et perméables aux ions. Dès lors, ces mobilités électrophorétiques sont analysées par des modèles théoriques prenant en compte ces différents caractères et conduisant à définir une densité de charge (ρ_0) à l'intérieur d'une zone polymérique présentant une certaine perméabilité (mollesse hydrodynamique, λ_0^{-1} : capacité du flux à pénétrer dans le polymère) et une certaine hétérogénéité spatiale (Fig. 3). La quantification de ces paramètres repose sur la modélisation des données de mobilités électrophorétiques en fonction de la force ionique. En effet, l'augmentation du caractère mou-perméable conduit à un changement significatif des profils mobilité-force ionique (Fig. 4).

2.2. Applications en microbiologie

Les premiers travaux prenant en compte le caractère mou pour décrire les mobilités électrophorétiques ont été réalisés par Ohshima [8,9]. Dans son modèle, il a proposé de repré-

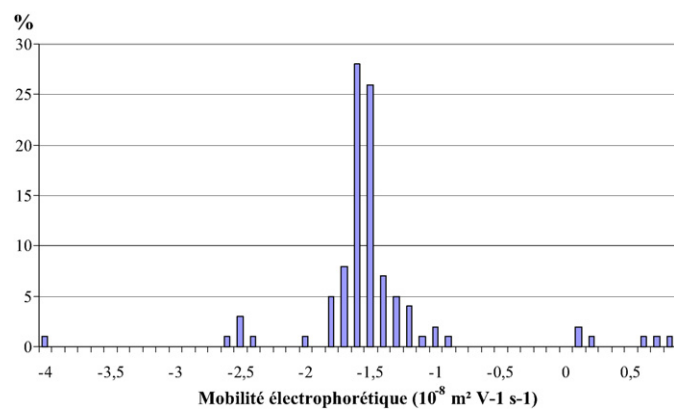


Fig. 2. Exemple d'histogramme de répartition des bactéries en fonction de leur mobilité électrophorétique. Histogramme obtenu pour *E. coli* ATCC 25922 en présence d'amoxicilline.

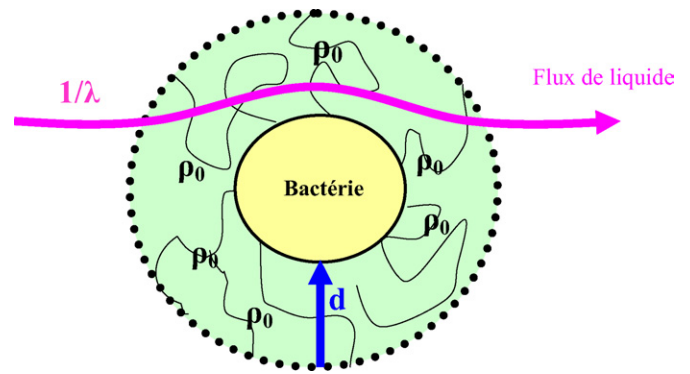


Fig. 3. Paramètres à prendre en compte pour la modélisation de la mobilité électrophorétique d'une bactérie. $1/\lambda$: paramètre hydrodynamique ; d : épaisseur du polymère ; ρ_0 : densité de charge du polymère [19].

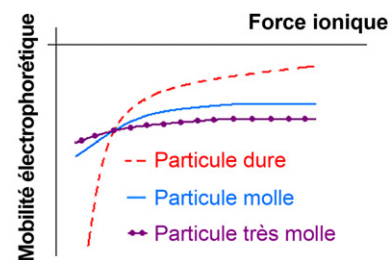


Fig. 4. Évolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique dans le cas de bioparticules. Permet de distinguer les bioparticules présentant une interface plus ou moins dure de celles qui peuvent être molles ou très molles.

senter des objets biologiques par une particule centrale (dite dure) recouverte d'un polymère souple et perméable (Fig. 3). Ce modèle très simplifié a déjà été utilisé avec succès pour décrire la surface d'érythrocytes humains [10] et de lymphocytes de rat [11]. Il a aussi permis, dans certains cas, de différencier les propriétés de surface de différentes espèces ou genres bactériens. Ainsi, Sonohara et al. ont montré que cette technique est apte à distinguer *Escherichia coli* (bacille à Gram négatif), dont la surface est plus rigide et plus chargée négativement, de *Staphylococcus aureus* (cocci à Gram positif) [12]. Bos et al., quant à eux, ont souligné la capacité de la microélectrophorèse à différencier deux souches de *Streptococcus salivarius* : l'une porteuse de fibrilles dont l'interface apparaît plus souple ($\lambda_0^{-1} = 1,4$ nm), l'autre, plus rigide ($\lambda_0^{-1} = 0,7$ nm), en étant dénuée [13]. Enfin, Morisaki et al., ont étudié la mobilité de trois souches de *Vibrio alginolyticus*, porteuses ou non de flagelles, et leur adhésion sur une surface de verre. Ils ont montré que le taux d'adhésion des bactéries est dépendant des caractéristiques électrohydrodynamiques (densité de charge et perméabilité) [14]. Le même résultat a été obtenu par Takashima et Morisaki sur des souches de *Pseudomonas syringae* pour comprendre l'adhésion sur des surfaces de verre [15]. Mais ces différents résultats ont aussi montré les limitations du modèle proposé par Ohshima. Récemment, Duval et al. ont proposé un nouveau modèle permettant de l'appliquer sans restriction de taille et de charge à des cellules biologiques, eucaryotes ou procaryotes [16–18]. Cette avancée théorique a permis de

mettre en évidence le caractère fortement hétérogène des interfaces bactéries–solution aqueuse en fonction de la force ionique [19]. Son application à d'autres systèmes semble très prometteuse et ouvre de nouvelles voies d'investigation.

2.3. Avantages et limites

La microélectrophorèse permet d'appréhender de façon globale une modification des propriétés de surface de souches bactériennes, mais aussi de façon plus quantitative par obtention de paramètres électrohydrodynamiques (ρ_0 , λ_0^{-1}). Ces mesures conduites en milieu aqueux ne dénaturent en aucun cas les ultrastructures de surface. C'est une technique simple à mettre en œuvre, l'unique étape de préparation étant la mise en culture des bactéries et leurs lavages.

Cependant, il a été montré que la répétition des mesures sur trois cultures séparées d'*E. coli* Hu734 donnait des valeurs de mobilité moyenne sensiblement différentes, respectivement de $-2,4$, $-2,1$, $-1,8 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ [7]. De plus, cette dispersion des mesures observée dans certains cas peut être accentuée par la présence de plusieurs populations et souligne la nécessité d'examiner chacune des distributions avant de calculer les valeurs moyennes. En effet, les échantillons biologiques peuvent être fortement hétérogènes avec des comportements complexes comme par exemple deux sous-populations au sein d'une même suspension bactérienne, ce phénomène existant en particulier pour les isolats environnementaux ou cliniques (isolés des flores commensales ou d'infections urinaires par exemple). Différents paramètres peuvent aussi influencer la mesure de mobilité électrophorétique des bactéries. Kiers et al. ont étudié l'influence du milieu de culture, liquide (bouillon trypticase soja) ou solide (gélose au sang), sur la mobilité de *Staphylococcus epidermidis*. Ils ont montré que la culture sur milieu gélosé augmente la perméabilité hydrodynamique (λ_0^{-1}) [20].

En conclusion, toutes ces études montrent bien l'étendue des applications envisageables en microbiologie, et ses limites. Aucune étude, à notre connaissance, n'a porté sur l'évaluation de cet outil à des fins d'étude de molécules anti-infectieuses, que ce soit sur des bactéries, des champignons ou des parasites. Permettant d'appréhender diverses modifications de la paroi, en termes de densité charge et de perméabilité hydrodynamique, la microélectrophorèse pourrait aussi être envisagée comme technique d'évaluation de l'impact de molécules antibactériennes au niveau de la paroi, et donner ainsi une orientation dans la recherche d'une cible d'action.

3. Microscopie à force atomique (AFM)

3.1. Principe

La microscopie à force atomique (AFM : *atomic force microscopy*) doit son invention en 1985 à G. Binnig et H. Rohrer (prix Nobel de physique en 1986) [6].

Le principe de fonctionnement du microscope est basé sur la détection des forces intermoléculaires (capillaires, électrostatiques, Van der Waals, frictions...) s'exerçant entre une pointe et

la surface d'un échantillon. Cette microscopie permet d'imager et de mesurer les forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon, et ce, indépendamment de la nature des échantillons (biologique, organique, minérale). Cette pointe est associée à un levier de constante de raideur fixe (Fig. 5). Ce microlevier est solidaire d'un dispositif qui guide son déplacement vertical (en z, perpendiculaire à la surface) grâce à un transducteur piézoélectrique (céramique). Les déplacements latéraux (en x et y, plan de la surface) sont contrôlés par deux transducteurs le plus souvent positionnés au niveau du porte échantillon. La mesure des forces d'interaction exercées sur la pointe est réalisée par l'intermédiaire d'un laser focalisé à l'extrémité du microlevier (au-dessus de la pointe). La réflexion de ce signal laser est ensuite collectée sur un détecteur constitué de quatre cellules photoélectriques. C'est cette position sur le détecteur qui va permettre de quantifier la déflexion de la pointe avec une résolution de l'ordre du piconewton.

En imagerie, la position verticale de la pointe est contrôlée en permanence dans le but de maintenir constante une consigne au cours du balayage x–y. Cette consigne suivant le mode d'imagerie est liée soit à la déflexion du levier (mode contact), soit à l'amplitude d'oscillation de ce même levier (mode non-contact, contact intermittent ou *tapping*). Ces différents modes permettent d'acquérir des images tridimensionnelles de la surface d'un échantillon. Toutefois, il faut préciser que le mode contact mesure directement la topographie, c'est-à-dire le relief des surfaces, mais que dans le cas de surfaces déformables, ce relief est d'autant plus diminué que la particule peut se déformer au cours de l'image.

Bien que la microscopie à force atomique ait été initialement développée comme une méthode d'imagerie haute résolution, cette technique permet aussi de mesurer localement les forces d'interaction pointe–échantillon, plus connue sous le nom de spectroscopie de force [21–23]. Dans le cas de cette étude, nous n'avons pas utilisé ce mode, le lecteur pourra se référer aux références citées précédemment.

3.2. Applications en microbiologie de l'imagerie AFM

En mode image, cette technique permet d'imager les cellules en solution et ainsi visualiser les changements morphologiques

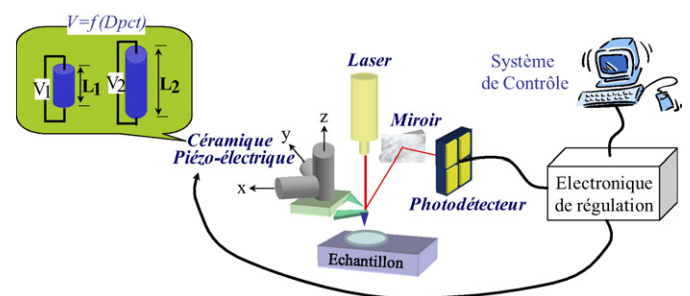


Fig. 5. Représentation schématique de l'instrumentation d'un microscope à force atomique.

de la membrane bactérienne lors de processus physiologiques [24].

Cette technique peut aussi permettre de visualiser dans certains cas les altérations des parois bactériennes suite à un traitement par des molécules antibactériennes. Cependant, il est important de noter que les études réalisées avec des méthodes d'immobilisation par séchage à l'air ou par fixation au glutaraldéhyde sont à prendre avec beaucoup de précautions étant donné le caractère très dénaturant de ces méthodes de préparation. Des méthodes alternatives ont été largement développées permettant d'immobiliser les cellules soit sur des supports positifs, soit dans les pores d'une membrane poreuse puis dans les images directement en solution [25].

La possibilité de visualiser par AFM l'effet de molécules antibiotiques sur la paroi des cellules a été réalisée à l'air avant et après exposition avec cette molécule [26–31]. Ainsi, l'AFM a permis de visualiser les changements morphologiques de la paroi d'*E. coli* avant et après exposition à la cefodizime, une céphalosporine à large spectre [26]. Ils ont montré différentes formes de dommages cellulaires, allant de la formation de pores dans la membrane externe à la lyse complète des bactéries. Cette même équipe a évalué les dommages structuraux causés par la daptomycine sur la paroi de *Bacillus cereus*, ainsi que ceux consécutifs au traitement de *S. aureus* et *Moraxella catarrhalis* par la moxifloxacine [27,28].

Mais même si ces études montrent des effets significatifs (formation de pores, lyse) sur différents systèmes bactériens (ex : *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*...), il est très difficile d'occulter les artefacts dus à la préparation des échantillons. Dans ce contexte, une seule étude a été réalisée in situ en solution en immobilisant les cellules dans les pores d'une membrane afin d'observer les effets de molécules antibiotiques (isoniazide, streptomycine et éthambutol) [32]. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence l'augmentation de la rugosité de surface des cellules associée à l'apparition de stries suivant la concentration des molécules.

3.3. Avantages et limites

D'une manière générale, l'utilisation de la microscopie à force atomique en microbiologie est de plus en plus répandue. En effet, l'AFM constitue maintenant un outil de choix pour visualiser, manipuler et mesurer les phénomènes au niveau des interfaces bactériennes. Que ce soit pour réaliser des images ou mesurer les forces d'interaction à la surface des bactéries, une des exigences de la microscopie à force atomique repose sur l'immobilisation de l'échantillon. Dans ce cas, la préparation des échantillons est primordiale de manière à observer les cellules dans leur état natif. Les méthodes utilisées initialement comme le séchage à l'air ou la fixation par glutaraldéhyde, sont bien connues pour dénaturer les structures de surface des cellules. En revanche, l'adsorption physique de cellules sur des surfaces positives (exemple : polymères cationiques, aciers) ou dans une membrane présentant des pores de taille comparable à celle des cellules permet d'obtenir dans la plupart des cas une adhésion suffisante, tout en maintenant la

viabilité des micro-organismes étudiés. Une fois cette immobilisation optimisée, l'imagerie permet un suivi dynamique des structures de surface avec des résolutions latérales nanométriques.

Quant à la spectroscopie de force, elle mesure des forces d'interaction pointe-échantillon en relation avec les forces de surface et les propriétés nanomécaniques et viscoélastiques des cellules. De plus lorsque cette pointe est fonctionnalisée, cette spectroscopie permet dans une certaine mesure de quantifier les interactions non spécifiques (électrostatiques, hydrophobes) et aussi des interactions non spécifiques récepteur-ligand. Enfin, il faut souligner que cette microscopie peut être couplée à des microscopies optiques (épifluorescence, confocal) afin de localiser visuellement les bactéries sur la surface.

Dans le contexte de l'effet de molécules antibiotiques sur les parois bactériennes, très peu d'études ont été réalisées directement en solution. De plus, la spectroscopie de force n'a à ce jour jamais été réalisée, dans un objectif de quantification de l'évolution des propriétés nanomécaniques ou viscoélastiques après exposition de molécules antibiotiques. Une des raisons est probablement la difficulté de mise en œuvre de cette technique qui nécessite un certain savoir-faire expérimental et théorique.

4. Applications à la recherche de la cible d'action de molécules antibactériennes

Les bactéries résistantes aux antibiotiques et aux antiseptiques utilisés en routine sont une cause majeure d'infections nosocomiales. Peu de nouveaux antibiotiques (tigécycline, daptomycine) ont vu le jour ces dernières années. Découvrir de nouvelles thérapeutiques, avec un mécanisme d'action innovant, est nécessaire, afin de pallier les mécanismes de résistance identifiés actuellement.

Les bactéries présentant une charge globale nette de surface négative, dont la neutralisation ou la désorganisation contrôlée pourrait résulter en un effet délétère, nous avons développé une approche liée à l'apport de contre charges positives préorganisées, molécules élaborées à partir de calixarènes. Nous avons montré le rôle clé de la préorganisation spatiale de monomères paraganidinoéthylphénol en un tétramère cyclique (paraganidinoéthylcalix[4]arène) pour l'obtention d'une activité antibactérienne. De plus, par comparaison avec l'hexamidine et la synthaline A, choisies comme référence, notre composé apparaît comme celui conjuguant l'activité antibactérienne la plus intéressante associée à une absence de cytotoxicité sur cellules HaCaT et MRC-5 [33,34]. Ces résultats sont particulièrement encourageants quant à un éventuel usage du paraganidinoéthylcalix[4]arène en tant qu'agent antiseptique ou de désinfection, ou en tant qu'adjuvant de chimiothérapie anti-infectieuse. Néanmoins, il reste à définir la ou les cibles d'action de ce composé.

La première interface entre bactéries et molécules antibactériennes étant la paroi bactérienne, nous avons choisi d'étudier les éventuels effets pariétaux de notre composé avec les deux outils présentés ci-dessus : microélectrophorèse et AFM [35].

4.1. Microélectrophorèse : outil d'étude des modifications des propriétés de surface après traitement antibactérien ?

Comme nous l'avons vu précédemment, la microélectrophorèse offre une évaluation globale des propriétés interfaciales des bactéries. Cette technique nous permet d'étudier, par modification de la mobilité électrophorétique moyenne des bactéries, d'éventuels changements sur les profils des courbes « mobilités » en fonction de la force ionique. Ces changements sont en relation avec des changements de perméabilité et/ou de densité de charges des structures les plus externes des cellules.

Les résultats obtenus en microélectrophorèse démontrent tout d'abord que cette technique présente une sensibilité suffisante pour différencier, grâce à leurs propriétés de surface, les quatre souches étudiées (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853). Ainsi, pour les souches non traitées, nous avons montré que *E. faecalis* se distingue des trois autres souches, avec une mobilité électrophorétique moyenne de $-2,8 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ à une force ionique de 10^{-3} mol/l , contre environ $-2,1 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ pour les autres souches.

L'évaluation de l'effet du traitement par les différents composés a été menée sur *P. aeruginosa* ATCC 27853. Après 24 heures d'exposition à l'hexamidine ou au paraganidinoéthylphénol (forme monomérique), aucune modification de la mobilité électrophorétique moyenne n'a été obtenue dans nos conditions expérimentales. En revanche, lors du traitement par le calixarène, une diminution significative de la mobilité a été observée. Cet effet traduit une augmentation très significative du caractère perméable des parois en présence de cette molécule et/ou une adsorption spécifique des calixarènes en surface des bactéries. Des analyses théoriques des différents profils obtenus sont actuellement en cours : quantification respectivement de la densité de charge et du caractère mou des couches les plus externes de l'enveloppe, avant et après traitement, de manière à distinguer les effets de sorption de ceux conduisant à la perte–augmentation du caractère mou–dur des parois.

4.2. AFM : outil d'étude des altérations pariétales à l'échelle nanométrique après traitement antibactérien ?

L'AFM nous a apporté des informations complémentaires à celles obtenues en microélectrophorèse, grâce aux images obtenues en mode contact, sur *P. aeruginosa* ATCC 27853. Les images nous ont permis d'appréhender des altérations de la paroi bactérienne après 24 heures d'exposition au calixarène, à type de brèches ou de « lambeaux » de paroi semblant se décrocher du corps bactérien. Au cours de nos expérimentations, nous nous sommes par ailleurs heurtés au problème d'adhésion des bactéries sur les lames de verre recouvertes de polyéthylèneimine : soit les bactéries n'adhéraient pas du tout, soit l'adhésion était trop faible et les bactéries étaient emportées lors du balayage par la pointe. Trois souches non traitées ont été testées dans un premier temps : *E. coli*, *E. faecalis* et *P. aeruginosa*. L'adhésion des deux premières était inconsistante, nous avons donc poursuivi notre étude sur

P. aeruginosa. Il est à prendre en compte aussi un éventuel changement des propriétés de surface liée au traitement, et donc une modification de la capacité d'adhésion des bactéries traitées ; c'est ce qui a été observé après 24 heures d'exposition au calixarène, avec une augmentation de la sensibilité des bactéries au passage de la pointe.

Ainsi, cette étude nous a permis de montrer que les caractéristiques électrophorétiques et les images obtenues par AFM, après traitement antibactérien permettent d'apprécier les différents modes d'action des molécules. Ainsi, nous avons montré que la paraganidinoéthylcalix[4]arène entraîne des altérations de la paroi de *P. aeruginosa* avec une perte accrue de la perméabilité de la paroi. La combinaison de ces deux méthodes semble très prometteuse pour identifier les mécanismes des traitements antibactériens et ainsi optimiser la chimie de ces molécules [35].

5. Conclusion

Les études présentées ici indiquent que la microélectrophorèse et l'AFM sont deux outils pouvant apporter de nombreuses informations, dans le domaine de la microbiologie, sur les propriétés de surface des microorganismes et l'éventuel effet pariétal de molécules anti-infectieuses. Mais des progrès sont encore à réaliser : préparation de l'échantillon, instrumentation, conditions nécessaires à la viabilité des micro-organismes..., afin d'améliorer à la fois l'exactitude et la reproductibilité des mesures. Par ailleurs, une des perspectives de l'AFM serait d'utiliser des pointes fonctionnalisées (sur lesquelles est fixé un antibiotique par exemple) afin de mieux appréhender les interactions surface bactérienne–molécule antibactérienne.

L'originalité de notre approche expérimentale repose sur l'utilisation de diverses méthodologies, du micromètre au nanomètre, préservant au mieux la paroi bactérienne (réalisation en milieu liquide), et permettant d'étudier l'effet de molécules antibactériennes à la fois à l'échelle d'une population (microélectrophorèse) et à l'échelle d'un individu (AFM).

Remerciements

Ce travail a été financé par le ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche ; le Centre national de la recherche scientifique et l'Institut Jean-Barriol. M. Mourer a bénéficié d'une allocation ministérielle pour son travail de thèse.

Références

- [1] Duval JFL, Ohshima H. Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* 2006;22:3533–46.
- [2] Duval JFL, Busscher HJ, van de Belt-Gritter B, van der Mei HC, Norde W. Analysis of the interfacial properties of fibrillated and non-fibrillated oral streptococcal strains from electrophoretic mobility and titration measurements: evidence for the Shortcomings of the 'classical soft-particle approach. *Langmuir* 2005;21:11268–82.
- [3] Dague E, Duval J, Jorand F, Thomas F, Gaboriaud F. Probing surface structures of *Shewanella* spp. by microelectrophoresis. *Biophys J* 2006; 90(7):2612–21.

- [4] Gaboriaud F, Dague E, Baillet S, Jorand F, Duval J, Thomas F. Multi-scale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as a response to a pH change. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006;52:108–16.
- [5] Beveridge TJ. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 1999;181:4725–33.
- [6] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 1986;56:930–3.
- [7] Van der Mei HC, Busscher HJ. Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:491–4.
- [8] Ohshima H, Kondo T. On the electrophoretic mobility of biological cells. *Biophys Chem* 1991;39:191–8.
- [9] Ohshima H. Electrophoretic mobility of soft particles. *Electrophoresis* 1995;16:1360–3.
- [10] Kawahata S, Ohshima H, Maramatsu N, Kondo T. Charge distribution in the surface region of human erythrocytes from electrophoretic mobility data. *J Colloid Interface Sci* 1990;138:182–6.
- [11] Morita K, Muramatsu N, Ohshima H, Kondo T. Electrophoretic behaviour of rat lymphocyte subpopulations. *J Colloid Interface Sci* 1991;147:457–61.
- [12] Sonohara R, Muramatsu N, Ohshima H, Kondo T. Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophys Chem* 1995;55:273–7.
- [13] Bos R, Van der Mei HC, Busscher HJ. ‘Soft-particle’ analysis of the electrophoretic mobility of a fibrillated and non-fibrillated oral streptococcal strain: *Streptococcus salivarius*. *Biophys Chem* 1998;74:251–5.
- [14] Morisaki H, Nagai S, Ohshima H, Ikemoto E, Kogure K. The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology* 1999;145:2797–802.
- [15] Takashima S, Morisaki H. Surface characteristics of the microbial cell of *Pseudomonas syringae* and its relevance to cell attachment. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1997;9:205–12.
- [16] Duval JFL, Van Leuwen HP. Electrokinetics of diffuse soft interfaces. 1. Limit of low Donnan potentials. *Langmuir* 2004;20:10324–36.
- [17] Duval JFL. Electrokinetics of diffuse soft interfaces. 2. Analysis based on the nonlinear Poisson-Boltzmann equation. *Langmuir* 2005;21:3247–58.
- [18] Duval JFL, Ohshima H. Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* 2006;22:3533–46.
- [19] Dague E. Physicochimie des interfaces bactérie–solution aqueuse [thèse]. Nancy Université;2006. p 1–134.
- [20] Kiers PJM, Bos R, Van der Mei HC, Busscher HJ. The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grow in a liquid medium and on solid agar. *Microbiology* 2001;147:757–62.
- [21] Gaboriaud F, Dufrêne YF. Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007;54:10–9.
- [22] Dufrêne YF. Direct characterization of the physicochemical properties of fungal spores using functionalized AFM probes. *Biophys J* 2000;78:3286–91.
- [23] Dufrêne YF. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol* 2002;184:5205–13.
- [24] Touhami A, Jericho MH, Beveridge TJ. Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004;186:3286–95.
- [25] El Kirat K, Burton I, Dupres V, Dufrêne YF. Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *J Microsc* 2005;218:199–207.
- [26] Braga PC, Ricci D. Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:18–22.
- [27] Braga PC, Ricci D, Dal Sasso M. Daptomycin morphostructural damage in *Bacillus cereus* visualized by atomic microscopy. *J Chemother* 2002;14:336–41.
- [28] Braga PC, Culici M, Ricci D, Dal Sasso M. Morphostructural damage and the inhibition of bacterial adhesiveness of *Staphylococcus aureus* and *Moraxella catarrhalis* induced by moxifloxacin. *J Chemother* 2003;15:543–50.
- [29] Chen ZY, Xuo XP, Huang JY, Hong YM, Zhang Q. AFM study of the effect of metronidazole on surface structures of sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe* 2006;12:106–9.
- [30] Meincken M, Holroyd DL, Rautenbach M. Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4085–92.
- [31] Li A, Lee PY, Ho B, Ding JL, Lim CT. Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:411–8.
- [32] Verbelen C, Dupres V, Menozzi FD, Raze D, Baulard AR, Hols P, et al. Ethambutol-induced alterations in *Mycobacterium bovis* BCG imaged by atomic force microscopy. *FEMS Microbiol Lett* 2006;264:192–7.
- [33] Grare M, Mourer M, Regnouf-de-Vains J-B, Finance C, Duval RE. Towards new antibacterial drugs: interest of para-guanidinoethylcalix[4]arene. *Pathol Biol* 2006;54:470–6.
- [34] Grare M, Mourer M, Fontanay S, Regnouf-de-Vains J-B, Finance C, Duval RE. In vitro activity of para-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:575–81.
- [35] Grare M, Dague E, Mourer M, Duval JFL, Jorand F, Regnouf-de-Vains J-B, et al. Paraguanidinoethylcalix[4]arène : un premier pas vers la compréhension de sa cible d’action. 26^e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), Paris, 7–8 décembre 2006.

Chapitre 8

A LA RECHERCHE DE LA OU DES CIBLE(S) D'ACTION :
MODIFICATION DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE ?

GRARE ET AL., 2009B, CYTOMETRIE PART A. SOUMIS.

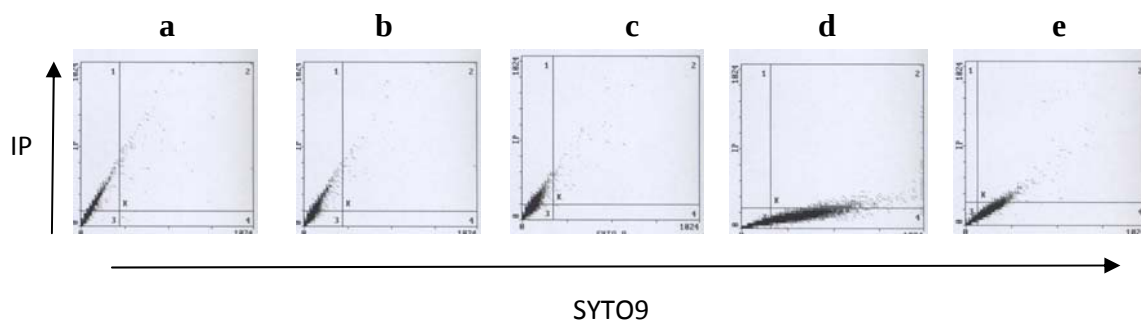


Figure 99 : Validation du marquage par le kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting, pour *S. aureus* ATCC 29213. Une culture en milieu liquide, en phase logarithmique de croissance, est utilisée comme témoin «vivant». Des bactéries traitées pendant 1 h à l'éthanol 70% est utilisé comme témoin « 100% mortes ». Un mélange en différentes proportions de ces deux témoins sont réalisés afin d'obtenir une gamme.

a : 100% mortes ; b : 75% mortes/25% vivantes ; c : 50% mortes/50% vivantes ; d : 25% mortes/75% vivantes ; e : 100% vivantes

I. OBJECTIFS

Peu nombreuses sont les méthodes qui existent à l'heure actuelle, pour sélectionner rapidement un bon candidat, parmi de nouvelles molécules à potentiel antibactérien. Afin de réaliser un 1^{er} criblage, et d'optimiser les molécules obtenues par une étude des relations structure-activité, il est nécessaire d'appréhender rapidement les interactions entre les antibactériens et les bactéries. Nous avons montré pour notre molécule, le Cx1, par une approche physico-chimique à deux échelles (macroscopique et nanométrique) que le Cx1 est capable d'induire des modifications de la surface bactérienne en terme de charge et de perméabilité (microélectrophorèse), et de modifier la paroi (brèches) et ses interactions avec la pointe de l'AFM (augmentation de la constante de raideur de la bactérie, et donc de la pression osmotique). Ces modifications pouvaient-elles altérer la perméabilité membranaire ? Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé la cytométrie en flux, en lui associant un kit de marquage par deux fluorochromes, SYTO9 et iodure de propidium, IP (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting kit®, Invitrogen). L'intérêt de la CMF est que cette technique permet d'étudier les changements morphologiques (taille, hétérogénéité de structure), et les caractéristiques individuelles des bactéries, au sein de toute une population, juste en quelques secondes. Cela nous permettait ainsi d'évaluer l'effet du Cx1 à l'échelle d'une bactérie, et aussi de toute la population. Par ailleurs l'addition de fluorochromes (SYTO9 capable de marquer les bactéries à paroi intacte, l'IP uniquement les bactéries à membrane altérée), apporte des informations supplémentaires sur d'éventuelles altérations de la perméabilité membranaire.

L'objectif de cette étude est d'apporter des informations complémentaires à celles obtenues par microélectrophorèse et AFM, sur les interactions du Cx1 avec la paroi bactérienne, et les éventuels effets sur la perméabilité membranaire.

II. RÉSULTATS & DISCUSSION

GRARE ET AL., 2009B, CYTOMETRIE PART A. SOUMIS.

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une communication affichée internationale :

10. **Grare M.**, Lafosse S., Massimba Dibama H., Regnoul-de-Vains J.-B., Finance C., Duval R.E.

Interest of a fluorochroms-based flow cytometry approach to evaluate impact of antibacterial drugs on bacterial cell wall. 48th ICAAC, October, 22-25th, 2008, Washington, USA.

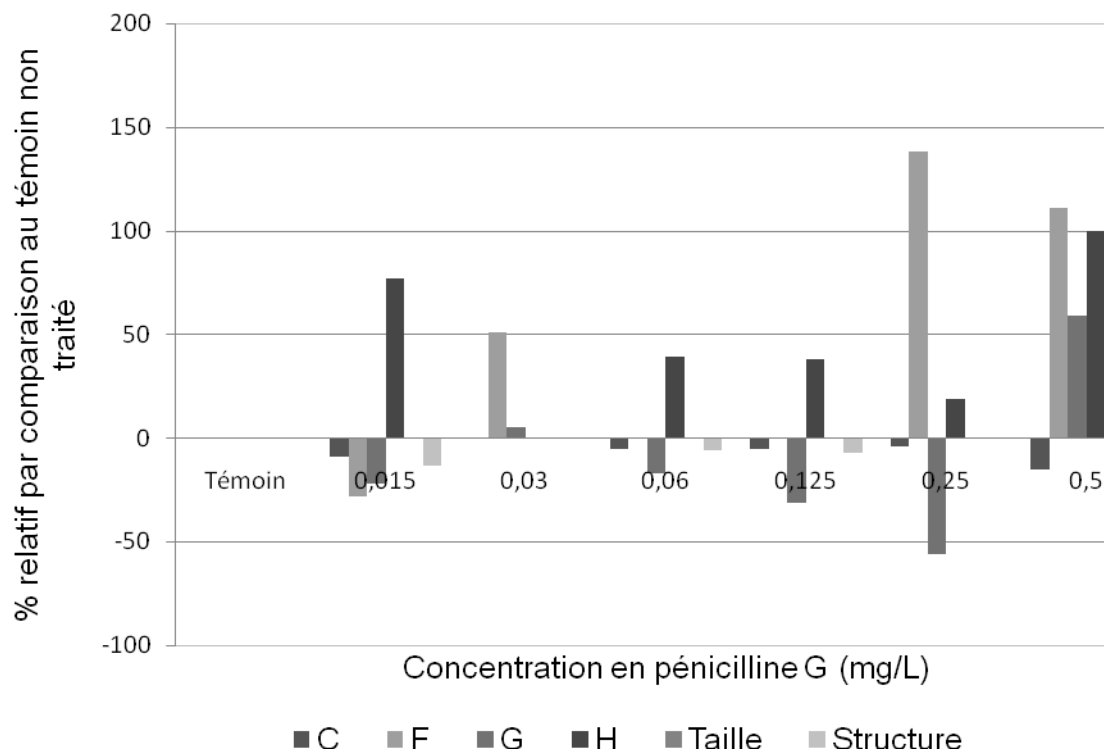


Figure 100 : Evolution de la taille et de l'hétérogénéité de la structure pour *S. aureus* ATCC 29213, après traitement par la pénicilline G.

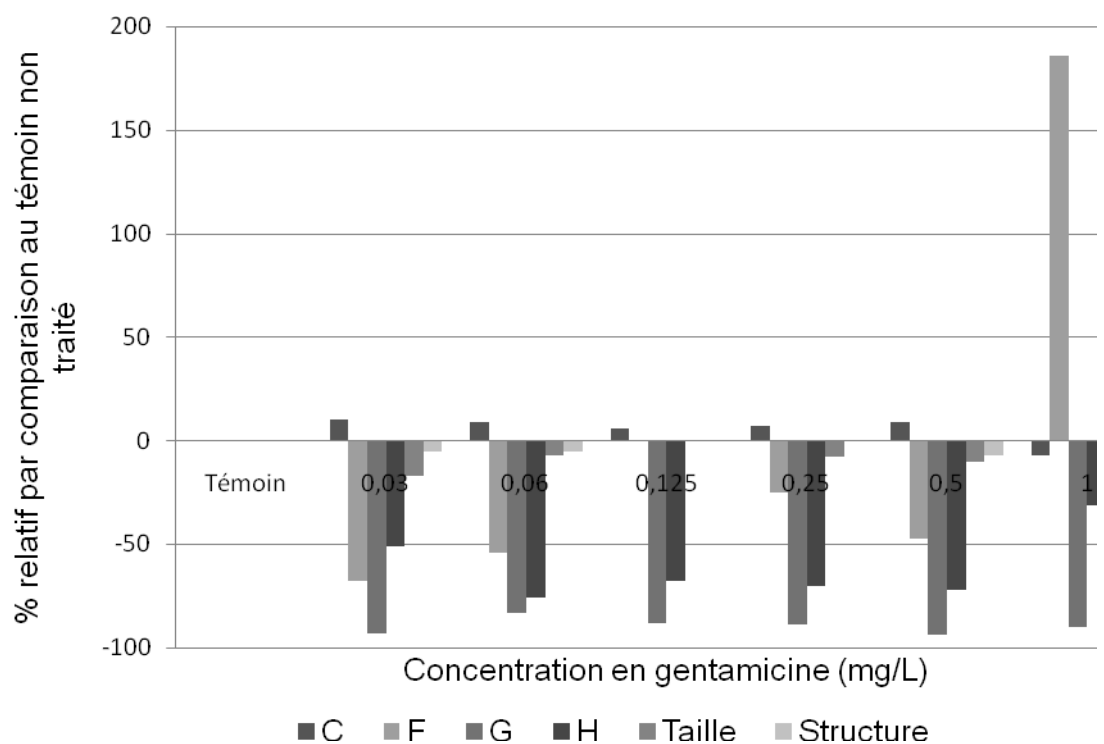


Figure 101 : Evolution de la taille et de l'hétérogénéité de la structure pour *S. aureus* ATCC 29213, après traitement par la gentamicine.

Ce travail a été récompensé par l'attribution du prix "Fellows Grant Travel", d'une valeur de 1000 dollars, remis par l'American Society for Microbiology (ASM).

N.B. : Nous avons tenté de réaliser cette même étude sur *S. aureus* ATCC 29213. Nous avons malheureusement rencontré des difficultés de définition des régions correspondant aux bactéries « vivantes » et « mortes » (Figure 99).

Nous avons cependant réalisé une étude d'évolution des profils FSC/SCC en fonction de l'antibiotique (pénicilline G, gentamicine) et de la concentration testée. Nous avons ainsi pu montrer des résultats très similaires à ceux obtenus avec *E. coli* ATCC 25922. Une augmentation de la taille et de l'hétérogénéité de la structure est observée avec la pénicilline G, à partir de la CMI (0,25 mg/L) (Figure 100) ; alors que la gentamicine semble avoir un effet inverse : diminution de la taille et homogénéisation de la population, effet plus visible que celui obtenu avec *E. coli* (Figure 101). Ainsi, des profils d'évolution différents sont obtenus avec ces deux antibiotiques, et peuvent éventuellement nous permettre d'appréhender le mécanisme d'action de nouveaux antibactériens. La chlorhexidine se caractérise par une augmentation de la taille et de l'hétérogénéité de la structure, comparable et même plus visible que ce qui a été obtenu avec la pénicilline G (Figure 102) ; cela traduit un effet au niveau pariétal et/ou intracellulaire (augmentation de la granulosité), qui n'avait pas été obtenu pour *E. coli*. Enfin, concernant les effets du Cx1 sur *S. aureus*, ils sont très similaires à ceux sur *E. coli* : augmentation très importante de la taille et de l'hétérogénéité de la population, dès 0,5xCMI, ces modifications étant graduelles, fonction de la concentration en Cx1 (Figure 103).

Cette étude menée sur *S. aureus* ATCC 29213, nous a permis de confirmer l'intérêt de l'utilisation de la cytométrie en flux, par réalisation des cytogrammes FSC/SSC, pour évaluer les effets de molécules antibactériennes. Il serait intéressant, dans les perspectives de ce travail, de continuer l'étude de perméabilité membranaire, et d'évaluer la pertinence de l'utilisation du kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting[®], chez une souche de cocci à Gram +.

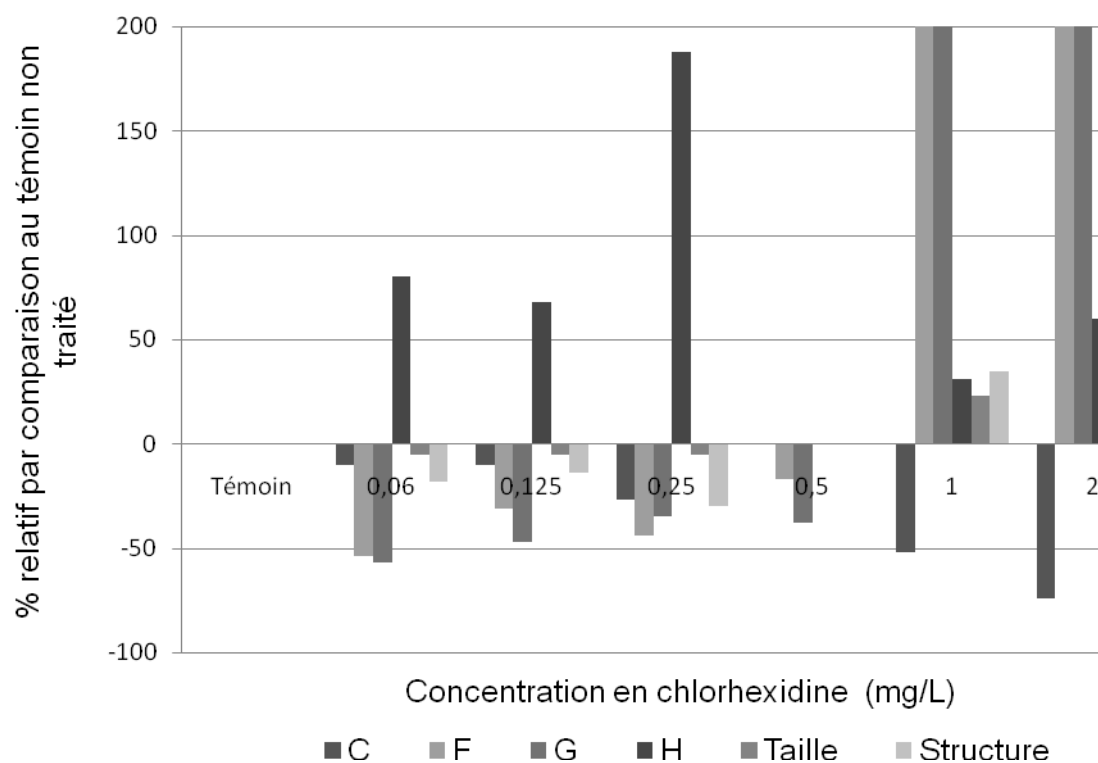


Figure 102 : Evolution de la taille et de l'hétérogénéité de la structure pour *S. aureus* ATCC 29213, après traitement par la chlorhexidine.

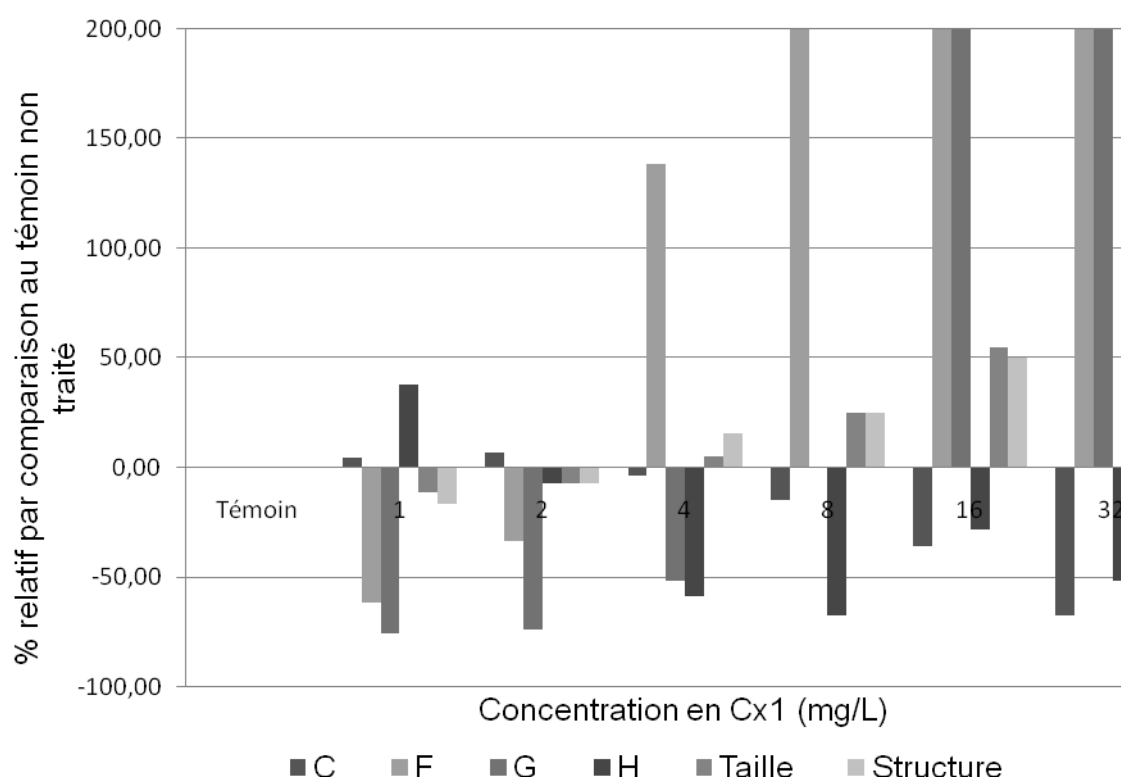


Figure 103 : Evolution de la taille et de l'hétérogénéité de la structure pour *S. aureus* ATCC 29213, après traitement par le Cx1

Chapitre 9

A LA RECHERCHE DE LA OU DES CIBLE(S) D'ACTION :
INTERACTIONS avec le LPS et/ou les LTA ?

I. OBJECTIFS

A ce stade de notre étude, nous en étions arrivé à cette conclusion : le Cx1 interagit avec la paroi bactérienne. Cela induit des modifications des propriétés de surface en terme de densité de charges et de perméabilité (microélectrophorèse) ; cela crée des brèches et induit une augmentation de la constante de raideur des bactéries (AFM) ; et enfin, nous avons montré que cela implique des changements de perméabilité membranaire, sans que ces altérations soient seules responsables de la lyse bactérienne (CMF & fluorochromes). Les 1^{ères} structures à l'interface entre les molécules cationiques antibactériennes et les bactéries sont : la membrane externe chez les bactéries à Gram – (dont le LPS), et le peptidoglycane chez les bactéries à Gram + (en particulier les acides lipoteichoïques, LTA). Pourquoi ces structures ? tout simplement parce qu'elles sont chargées négativement, et donc plus aptes à former des liaisons ioniques ou hydrogène avec les composés cationiques.

L'objectif de cette étude est donc de mettre en lumière la capacité éventuelle du Cx1 à séquestrer le LPS (*E. coli* O55:B5, et *P. aeruginosa*), et/ou le LTA (*S. aureus*).

II. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Le LPS est un des principaux composants de la membrane externe des bactéries à Gram -. Il se compose de trois parties : une partie oligosaccharidique porteuse de l'antigène O (de composition très variable d'un genre et d'une espèce à une autre), du core, hétéro-oligosaccharide reliant l'antigène O au lipide A (partie très conservée), et enfin du lipide A, partie « active » du LPS, porteuse d'une fonction endotoxine et responsable du déclenchement du choc septique. L'exosquelette est ensuite le même que celui des bactéries à Gram + : présence d'une couche de peptidoglycane (chaînes β 1,4 acide N-acétylmuramique/acide N-acétylglucuronique, avec un maillage de liaisons intermoléculaires peptidiques). Chez les bacilles à Gram -, cette couche de PG est fine, au niveau de la face interne de la membrane externe ; chez les bactéries à Gram +, cette couche est beaucoup plus épaisse, et la face externe du PG est hérissée d'acides lipoteichoïques (LTA), liés au PG par une partie diacylglycérol [Kimbrell et al., 2008]. Ces deux types de structures, LPS et LTA, sont polyanioniques et amphipathiques, ce qui peut expliquer qu'elles soient des « cibles » privilégiées des composés cationiques antibactériens ; mais elles sont aussi hautement variables d'une bactérie à une autre, ce qui peut expliquer la variabilité en terme de spectre d'activité de ces mêmes molécules. Il a été montré

récemment que les LTA, de même que le LPS, sont capables d'activer les polynucléaires neutrophiles, de stimuler la production de $\text{TNF}\alpha$, d' $\text{IL1}\beta$, d' IL6 ou d' IL10 (dans une moindre mesure cependant, par comparaison au LPS), et d'induire le relargage de certaines chimiokines (MCP-1, CCL5/RANTES, IL8, CXCL10) [Deininger et al., 2003 ; Kimbrell et al., 2008]. D'autres constituants pariétaux, tels que le PG, les polymères rhamnose-glucose retrouvés chez *Streptococcus* spp., ou encore le polysaccharide capsulaire des *Staphylococcus* spp., peuvent stimuler la production de médiateurs pro-inflammatoires *in vitro* [Mattsson et al., 1994 ; Soell et al., 1995a ; Soell et al., 1995b] ; mais aucune donnée n'existe à ce jour sur la responsabilité de ces composés dans le déclenchement du choc septique, et aucune molécule à notre connaissance, ne bloque ces structures.

Il a été montré que certaines molécules cationiques antibactériennes, sont capables d'agir à la fois sur les bactéries à Gram – et à Gram + [Balakrishna et al., 2006] ; cela suggère que ces composés interagissent avec et/ou déstabilisent la paroi de ces 2 types de bactéries, par interaction avec des structures différentes. L'exemple le plus ancien de ce type de molécule sont les antibiotiques de la famille des polymyxines. Ces antibiotiques peptidiques sont connus pour leur propriété de désorganisation de l'assemblage supramoléculaire du LPS de la membrane externe des bactéries à Gram -. La polymyxine B possède ainsi une affinité forte pour le LPS, et il a été montré plus récemment que cette affinité existe aussi vis-à-vis des LTA ; en conséquence, cette molécule sert de témoin positif, pour l'évaluation de la capacité d'autres molécules à se fixer à ces structures. Cette propriété de séquestration du LPS et/ou du LTA a déjà été montré pour les peptides cationiques [Scott et al., 1999], mais aussi pour d'autres petites molécules synthétiques telles que les acylpolyamines [Warshakoon et al., 2009], ou pour la chlorhexidine et l'alexidine [Zorko & Jerala, 2009]. Des études de relations structure-activité ont ainsi souligné, pour certains de composés cationiques, un lien étroit entre l'activité antibactérienne et la capacité à séquestrer le LPS et/ou le LTA, même si ces interactions sont encore mal comprises [Balakrishna et al., 2006 ; Warshakoon et al., 2009]. Ainsi, pour les acylpolyamines, il a été montré une relation structure-activité évidente, entre la longueur de la chaîne alkyl et la capacité à séquestrer le LPS de *E. coli* (chaîne optimale 16 carbones), ou les LTA de *S. aureus* (chaîne optimale entre 12 et 18 carbones) [Warshakoon et al., 2009]. Pour d'autres composés, de type guanylhydrazones, la neutralisation du LPS augmente avec la longueur de la chaîne ; l'effet optimal est obtenu pour une chaîne à 16 carbones, longueur semblant idéale pour interagir avec le domaine polyacyl du lipide A [Wu et al., 2009]. D'autres facteurs, par contre, comme

la basicité de la fonction cationique, ne semble pas jouer un rôle important pour la séquestration du LPS [Wu et al., 2009].

Cependant, il est apparu très tôt, que cette capacité de séquestration n'est pas toujours corrélée à la valeur de la CMI. Scott et coll. ont ainsi souligné que les interactions avec le LPS et les LTA, ne sont pas le mécanisme majeur d'action de certains peptides antibactériens, et probablement pas le mécanisme à l'origine de la mort bactérienne [Scott et al., 1999]. Cependant, réussir à bloquer le LPS et/ou les LTA, peut être très intéressant dans la prévention du choc septique, et dans le contrôle de la cascade de la réaction inflammatoire déclenchée par ces molécules. Certains peptides cationiques sont ainsi capables d'inhiber la réaction inflammatoire LPS-dépendante [Gough et al., 1996], ou LTA-dépendante, en bloquant la libération de TNF α par exemple [Scott et al., 1999]. Les guanylhydrazones précédemment décrites, sont elles aussi capables d'inhiber le relargage du TNF α , IL6, IL8 et IL10, en réponse au LPS [Wu et al., 2009]. D'autres molécules, actuellement en développement en tant que nouveaux antibactériens, ont montré une telle activité : hydroxychavicol par exemple [Sharma et al., 2009],

C'est dans cette optique, étant donné la structure polycationique du Cx1, et les résultats précédemment obtenus, que nous avons voulu tester le pouvoir de séquestration du LPS et du LTA de notre molécule.

III. MATÉRIELS & MÉTHODES

III.1.Principe

La polymyxine B est un antibiotique peptidique cyclique cationique, capable de se lier aux groupements anioniques de la paroi bactérienne. Elle se lie au LPS de la membrane externe des bactéries à Gram -, et augmente la perméabilité de cette membrane au lysozyme et aux composés hydrophobes. La dansyl-polymyxine B (DPX), composé peu fluorescent lorsqu'il est libre en solution, émet une fluorescence importante (excitation/émission ~340/485 nm) lorsqu'il se lie avec le LPS ou des bactéries intactes. La liaison du DPX avec le LPS peut être déplacée par d'autres antibiotiques polycationiques, ou par des cations tels que Mg²⁺. Ainsi, les expériences de déplacement du DPX peuvent être utilisées pour évaluer la capacité de composés cationiques à se lier au LPS, et par conséquent à interagir avec la paroi bactérienne.

III.2. Matériel & Réactifs

Tubes Falcon 15 mL

Plaque 96 puits pour lecteur à fluorescence (plastique blanc opaque)

LTA *S. aureus* (L2515-5MG, Sigma-Aldrich)

LPS *E. coli* O55:B5 (L2637-5MG, Sigma-Aldrich)

LPS *P. aeruginosa* (L8643-5MG, Sigma-Aldrich)

HEPES 5mM

Dansyl polymyxine B (DPX) (SKU#P-13238, Invitrogen)

Solution de la drogue à tester : Cx1 ($M = 1221,11 \text{ g/mol}$) fourni par le Pr. Regnouf de Vains sous forme de poudre blanche, repris en eau distillée stérile et filtrées sur $0,22 \mu\text{m}$ pour obtenir une solution stérile à 10^{-2} mol/L . Une nouvelle solution est préparée au minimum chaque semaine, et conservée à $+4^\circ\text{C}$.

III.3. Mode opératoire

1. Préparation de la solution de DPX à $10 \mu\text{M}$ (solution 4x concentrée, du fait de la dilution au $\frac{1}{4}$ réalisée dans chacun des puits de la plaque 96 puits)

La poudre de DPX contenue dans le flacon est reconstituée dans 1 mL d'HEPES à 5 mM, afin d'obtenir une solution à 58 nmol/L ($M = 1700 \text{ g/mol}$ pour le DPX). Pour la réalisation d'une plaque (60 puits, 20 par type de LPS ou LTA), il faut un volume de $25 \mu\text{L} \times 60 = 1,5 \text{ mL}$ de solution DPX à $10 \mu\text{M}$, soit $260 \mu\text{L}$ de la solution mère de DPX + $1240 \mu\text{L}$ d'HEPES 5 mM.

2. Préparation des solutions de LPS et LTA

Chaque flacon est reconstitué par addition d'1 mL d'HEPES 5 mM (laisser 15 min à température ambiante, ne pas trop agiter). La solution obtenue est à 5 mg/mL .

Pour le LTA : solution à $20 \mu\text{g/mL}$ (dilution au $\frac{1}{4}$ dans chacun des puits).

Pour le LPS (*E. coli* et *P. aeruginosa*) : solution à $8 \mu\text{g/mL}$ (dilution $\frac{1}{4}$ dans chacun des puits).

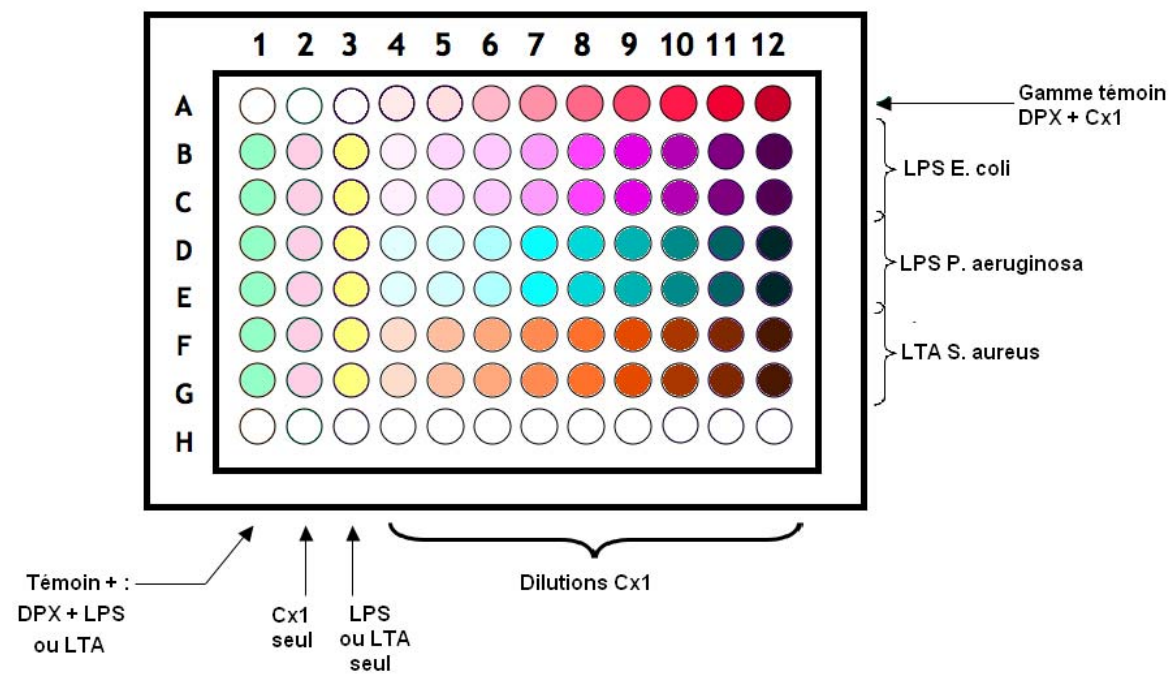


Figure 104 : Schéma de la plaque obtenue pour le test d'affinité LPS/LTA.

3. Préparation de la gamme de Cx1 : 512 à 2 mg/L.

Cette gamme est préparée en HEPES 5 mM à partir de la solution mère de Cx1 à 10^{-2} mol/L, dans des tubes Falcon de 15 mL.

4. Préparation de la plaque 96 puits

Chaque plaque comprend les témoins suivants :

- Témoin positif : DPX + LTA ou LPS, sans Cx1 (considéré comme le 100% fluorescence) ;
- Témoin Cx1 seul (à la plus forte concentration testée, pour éliminer une éventuelle fluorescence propre de notre composé) ;
- Témoin LPS seul ;
- Témoin DPX + Cx1, aux différentes concentrations testées (soustraction de la fluorescence éventuelle due à l'association de ces deux composés).

Les différentes solutions sont réparties comme suit :

- 25 μ L de LPS ou LTA dans les puits 1 et 3 à 12 ;
- 25 μ L de DPX dans les puits 1 et 4 à 12 ;
- 50 μ L des différentes solutions de Cx1, en commençant par la moins concentrée dans le puits 4, à la plus concentrée dans le puits 12 (cette solution est aussi déposée dans le puits 2, témoin Cx1 seul) ;
- la gamme DPX + Cx1 est réalisée dans la ligne A de la plaque, en déposant 25 μ L HEPES 5 mM, puis 25 μ L de DPX, puis 50 μ L des différentes solutions de Cx1.

A chaque expérience, chaque point est testé en double. Chaque expérience a été répétée 3 fois.

Le schéma de la plaque obtenue est présenté Figure 104.

5. Mesure de la fluorescence sur lecteur de plaque (λ_{exc} 355 nm, λ_{em} 538 nm)

La mesure de la fluorescence est effectuée toutes les 2 min pendant 30 min, afin d'obtenir des données de type cinétique sur le déplacement de la polymyxine par le Cx1. Le signal obtenu pour la solution de dansyl polymyxine B (DPX) à 2,5 μ M après liaison au LTA ou au LPS, est considéré comme 90 à 100% de la fluorescence maximale.

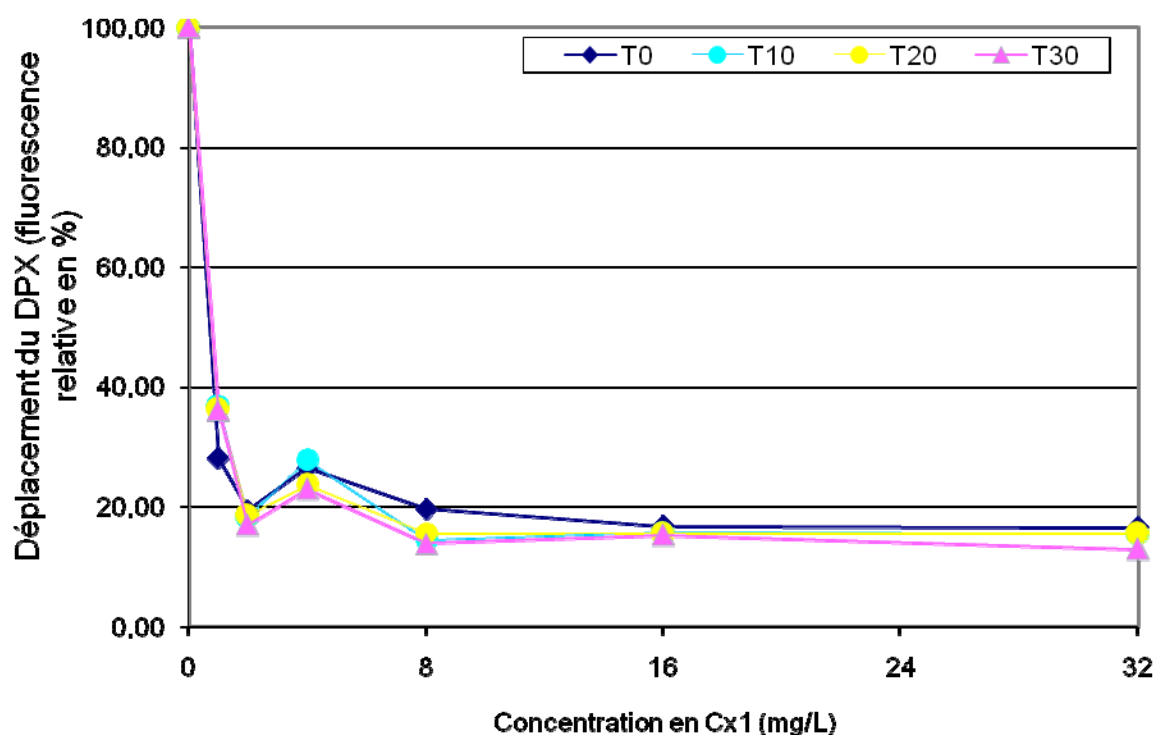


Figure 105 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 32 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LPS de *E. coli* O55:B5 (n = 3). Les courbes sont représentées respectivement après 0, 10, 20 et 30 min d'incubation.

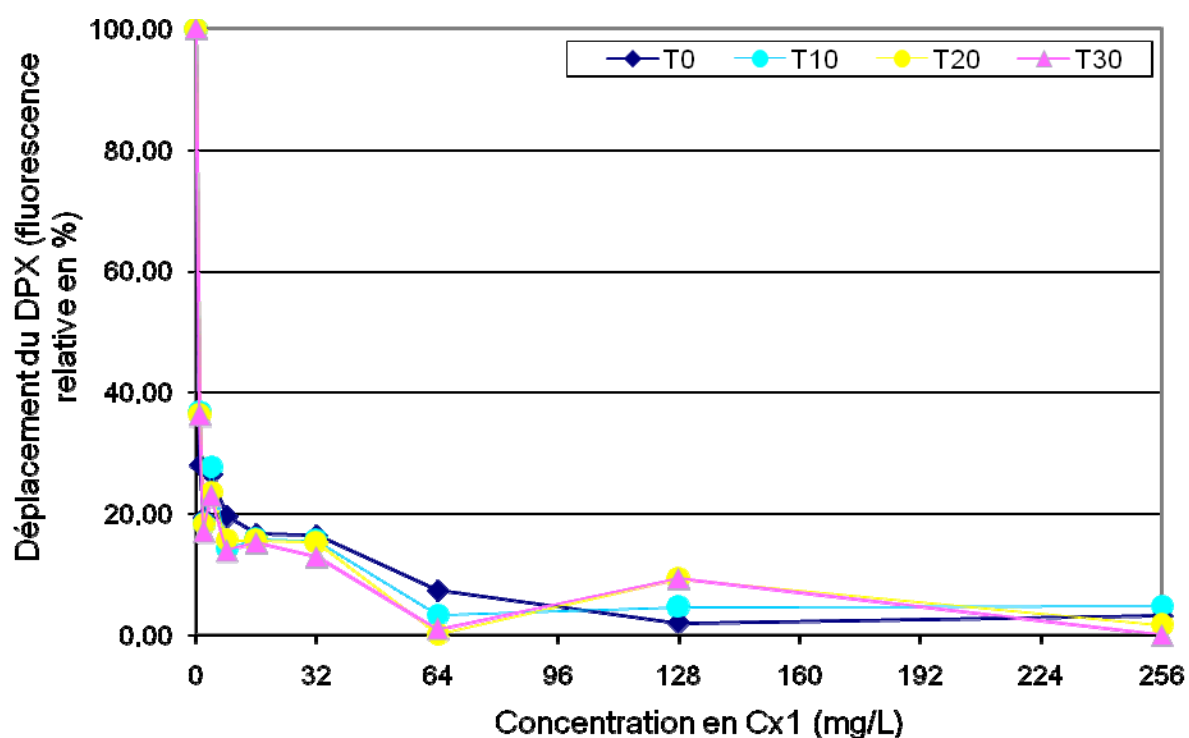


Figure 106 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 256 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LPS de *E. coli* O55:B5 (n = 3). Les courbes sont représentées respectivement après 0, 10, 20 et 30 min d'incubation.

Les résultats obtenus en présence de Cx1 seront exprimés en % de diminution de fluorescence par comparaison au signal obtenu avec DPX (après soustraction du bruit de fond DPX + Cx1).

IV. RÉSULTATS

IV.1. Résultats obtenus avec le LPS de *E. coli* O55:B5

La diminution de fluorescence par déplacement de la liaison DPX-LPS, est observable dès la concentration de 1 mg/L en Cx1 (fluorescence relative 35%), et maximale à 2 mg/L (20%). La fluorescence se stabilise ensuite aux environs de 15% jusqu'à 32 mg/L (Figure 105). Au delà de 64 mg/L, la fluorescence diminue progressivement pour se stabiliser à des valeurs < 10% (Figure 106). Une autre observation est intéressante : les courbes T0, T10, T20, et T30 sont parfaitement superposables, ce qui implique une stabilité de la liaison Cx1-LPS, et du déplacement du DPX.

IV.2. Résultats obtenus avec le LPS de *P. aeruginosa*

La diminution de fluorescence par déplacement de la liaison DPX-LPS est plus rapide que pour le LPS de *E. coli* : effet optimal dès 1 mg/L de Cx1 (fluorescence relative 25%). Cette diminution est relativement stable jusqu'à 32 mg/L (20-25%) (Figure 107). Une chute de la fluorescence pour une concentration de 64 mg/L (correspondant à 2xCMI), particulièrement visible à T0, avec une valeur <5%. Cette diminution est stable (fluorescence relative < 5%) jusqu'à 256 mg/L (Figure 108). De façon très intéressante, au delà de 32 mg/L (= CMI), cet effet s'estompe avec le temps : on observe une augmentation de la fluorescence relative entre T0 et T30, ce qui implique une séquestration de LPS de *P. aeruginosa* par le Cx1, moins stable que celle obtenue avec le LPS de *E. coli*. Ainsi, à 64 mg/L, la fluorescence relative est à 2% à T0, 10% à T10, 15% à T20 et 20% à T30. Ce phénomène est observable à 128 mg/L mais de manière moins prononcé (1% à T0, 6% à T10, 10% à T20, 14% à T30).

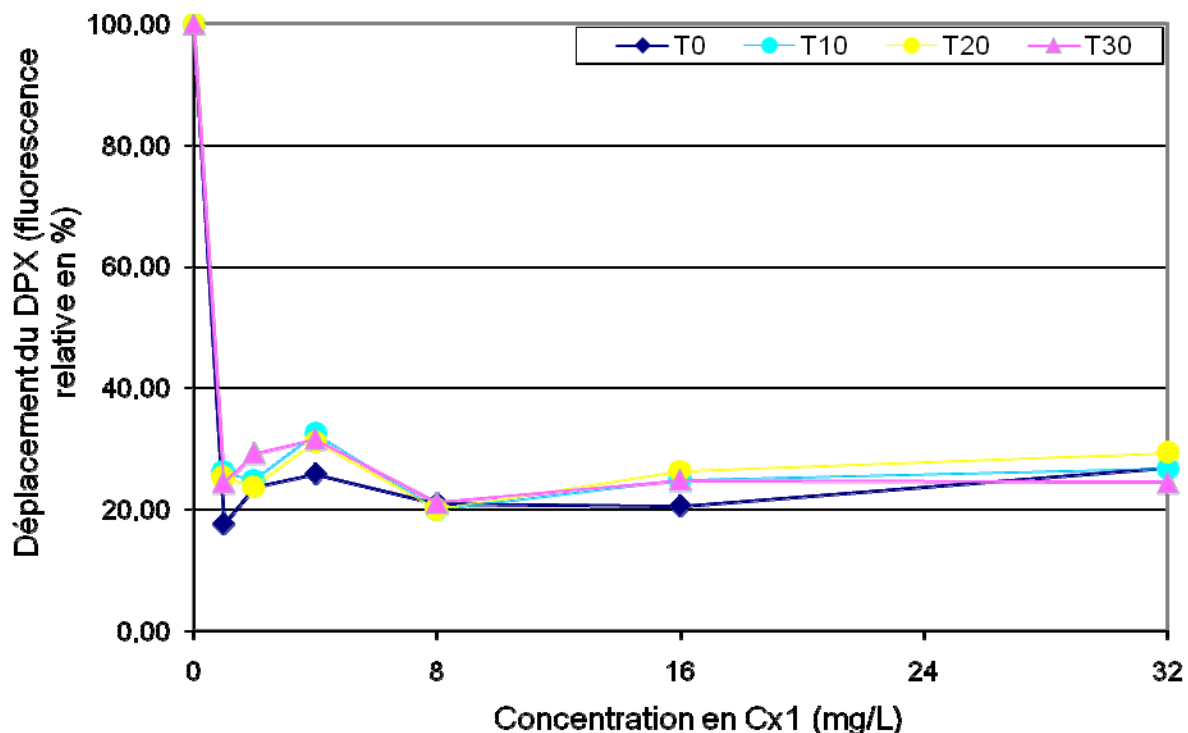


Figure 107 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 32 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LPS de *P. aeruginosa* (n = 3). Les courbes sont représentées respectivement après 0, 10, 20 et 30 min d'incubation.

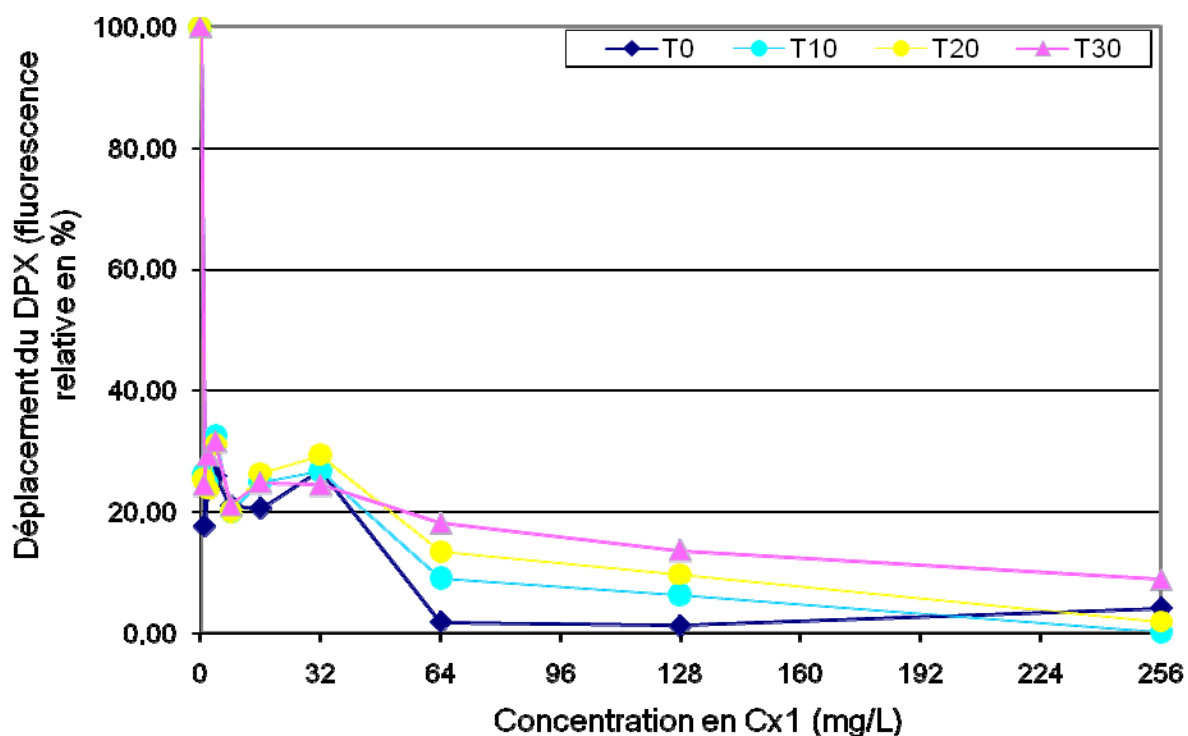


Figure 108 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 256 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LPS de *P. aeruginosa* (n = 3). Les courbes sont représentées respectivement après 0, 10, 20 et 30 min d'incubation.

IV. 3. Résultats obtenus avec le LTA de *S. aureus*

Le début de la courbe de diminution de la fluorescence en fonction de la concentration en Cx1 est assez semblable à ce qui a été obtenu avec le LPS de *E. coli* : effet maximal à 2 mg/L (0,25xCMI) avec une fluorescence relative à 25%, un effet rebond à 4 mg/L (fluorescence relative 40%), puis une stabilisation jusqu'à 32 mg/L (20-25%) (Figure 109). Au delà de 32 mg/L, la diminution de fluorescence est très rapide, comme ce qui a été obtenu avec le LPS de *P. aeruginosa* : stabilisation à des valeurs < 5% jusqu'à 256 mg/L (Figure 110). Les courbes obtenus aux différents temps sont superposables, impliquant une séquestration stable des LTA de *S. aureus* par le Cx1, avec cependant une légère ré-augmentation de la fluorescence à T30 (10%).

V. DISCUSSION

La fixation varie selon le type de composé testé, en terme de maximum d'efficacité (concentration pour laquelle le déplacement de la polymyxine est optimum), et de profil d'évolution du déplacement en fonction de la concentration. Cet effet maximum n'est pas forcément observé pour la concentration en Cx1 équivalente à la CMI. Certes, un effet maximum est obtenu pour 2 mg/L de Cx1 pour la liaison au LPS de *E. coli* O55:B5 (CMI Cx1 sur *E. coli* = 2-4 mg/L), avec une sorte d' « effet rebond » entre 8 et 16 mg/L, puis une stabilisation. Cette stabilisation pourrait s'expliquer par l'atteinte d'un équilibre de type « enzyme-substrat » avec fixation stable du Cx1 au LPS, et déplacement durable de la polymyxine. Mais avec le LPS de *P. aeruginosa* (CMI Cx1 = 32 mg/L), l'effet optimum est obtenu pour 1 mg/L, avec absence d'effet rebond, et stabilisation rapide à 80% d'inhibition de la fluorescence à partir de cette concentration. La liaison semble donc plus forte (20% vs. 30% d'inhibition) mais moins stable au cours du temps. Quand à la liaison aux LTA de *S. aureus*, le profil de liaison Cx1/LTA, est assez similaire à celui observé pour le LPS de *E. coli* : effet maximal à 2 mg/L, et courbes cinétiques stables au cours du temps.

Les effets maximum obtenus en terme de séquestration du LPS et du LTA, ne correspondent à la CMI pour aucune des souches testées. Cependant, il est intéressant de constater que pour *P. aeruginosa*, souche pour laquelle la CMI est la plus importante, la liaison au LPS n'est pas stable au cours du

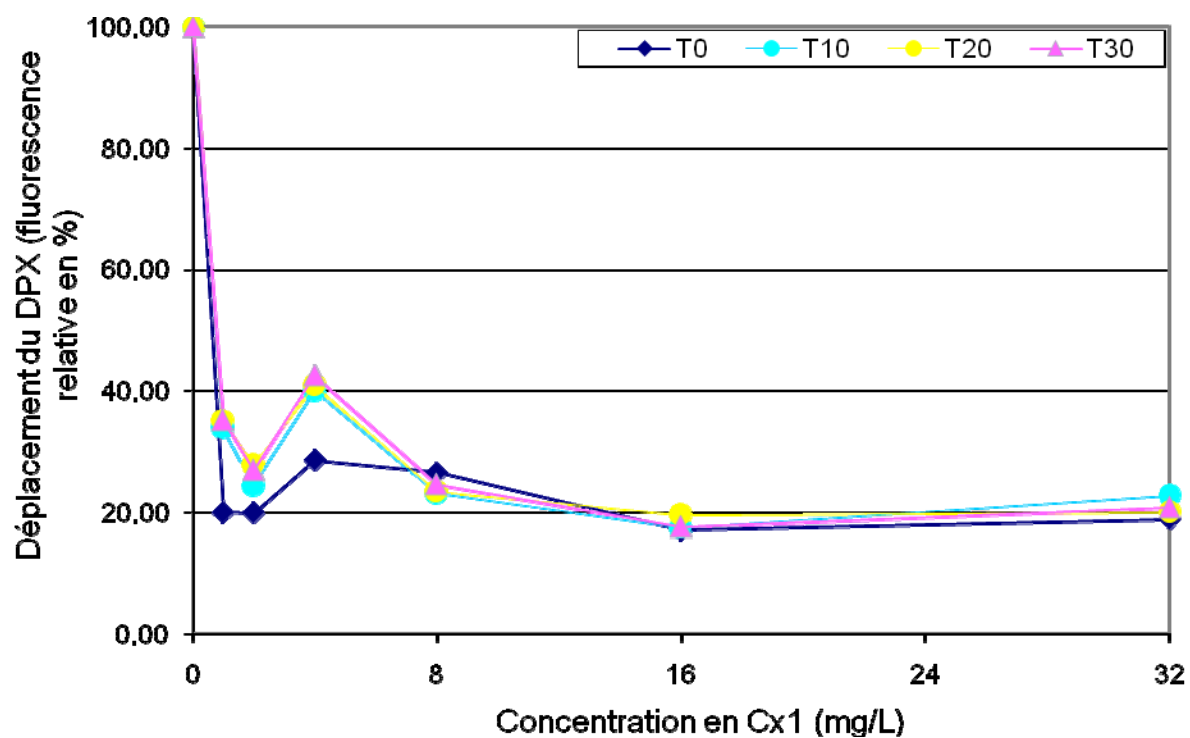


Figure 109 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 32 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LTA de *S. aureus* (n = 3). Les courbes sont représentées respectivement après 0, 10, 20 et 30 min d'incubation.

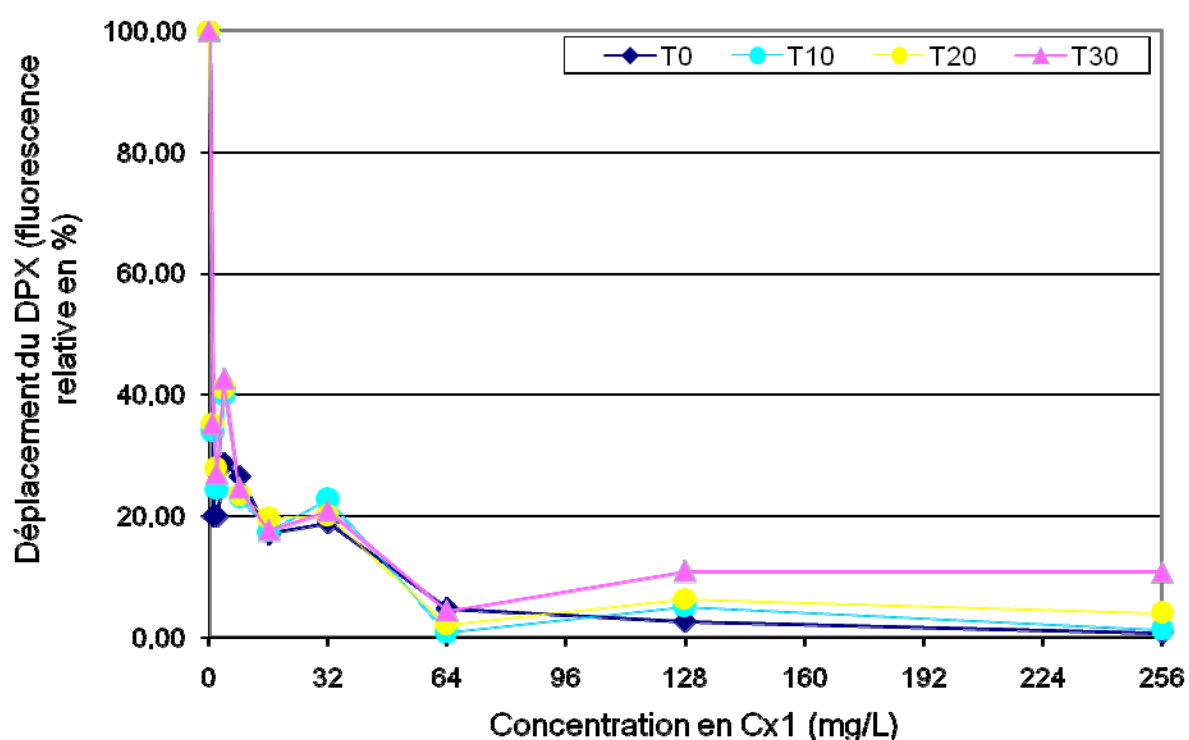


Figure 110 : Déplacement du DPX par le Cx1, 1 à 256 mg/L (fluorescence relative en %), en présence de LTA de *S. aureus* (n = 3). Les courbes sont représentées respectivement après 0, 10, 20 et 30 min d'incubation.

temps... Existe-t-il un lien ? Quels éléments constitutifs de *P. aeruginosa* pourraient expliquer l'instabilité de cette liaison ? Ces questions sont d'éventuelles voies d'exploration concernant les interactions Cx1/paroi bactérienne.

En conclusion, les résultats obtenus par cet essai LPS/LTA, confirment les données précédemment obtenues : le Cx1 interagit avec la paroi bactérienne, et semble capable de se lier au LPS et aux LTA.

r

DISCUSSION GENERALE

Le Cx1, une molécule prometteuse ?

La question principale, à l'origine de ce travail était la suivante : le para-guanidinoéthylcalix[4]arène (Cx1) a-t-il du potentiel en tant que nouvel agent antibactérien ? A la fin de ce travail, nous pouvons répondre : **OUI, le Cx1 a un intérêt, réel, en tant que nouveau composé cationique**, dans la grande famille des antibactériens. Oui, mais alors pourquoi ?

- (i) ce composé possède un spectre d'activité relativement large, étendu à un certain nombre de bactéries à Gram -, et à Gram +. Cette activité, intéressante, est de plus conservée sur des isolats cliniques, issus d'infections associées aux soins, comme les SARM, les ERG ou *E. coli* producteur de BLSE [Grare et al., 2007a ; Grare et al., 2009a].
- (ii) le Cx1 possède une activité de type bactéricide, concentration dépendante, avec un effet rapide (dans les 2 à 4 h selon les souches), et prolongé (jusqu'à 48 h). Ce type d'activité (bactéricide, rapide, concentration dépendante, et transitoire aux concentrations sub-bactéricides) est classiquement rencontrée pour certaines molécules, appelées perméabilisants membranaires. Nous en rediscuterons plus tard.
- (iii) à ce spectre large, est associée une absence de toxicité sur deux lignées de cellules eucaryotes (fibroblastes MRC-5 & kératinocytes HaCaT), fait marquant à l'heure où les nouvelles molécules commercialisées sont pointées du doigt du fait de leur importante toxicité (hématologique pour le linézolide ou veinotoxicité pour l'association quinupristine-dalfopristine, par exemple) [Grare et al., 2007a]. Les Index de Sélectivité (IS) obtenus pour le Cx1 sont particulièrement intéressants, supérieurs à ceux obtenus pour des antiseptiques très utilisés (hexamidine, chlorhexidine). Ainsi, nous avons montré que les IS du Cx1 se situent entre 16 (pour *P. aeruginosa*) et 131 (pour *E. coli*), IS bien supérieurs à ceux obtenus pour l'hexamidine (entre 1 et 15), et au minimum deux fois supérieurs à ceux obtenus pour la chlorhexidine (1 pour *P. aeruginosa* à 43 pour *E. coli*). Cela s'explique par l'absence de cytotoxicité (les deux antiseptiques présentant une toxicité importante sur les deux lignées cellulaires, dès 24 h de contact), et par une activité supérieure à l'hexamidine, et comparable à la chlorhexidine [Grare et al., 2007a ; Grare et al., 2009a].

En conclusion : le Cx1 a du potentiel !

Très bien me direz-vous... Mais encore ? Certes, cette molécule est intéressante d'un point de vue spectre, mais les CMI sur certaines souches sont supérieures à celles obtenues pour de nombreux antibiotiques... Il n'en demeure pas moins que la plupart des molécules commercialisées à l'heure actuelle ont un spectre quasi-exclusivement orienté vers les bactéries à Gram +, et sont même développées en ce sens (daptomycine ou linézolide par exemple). Quoiqu'il en soit, nous manquons, actuellement, de molécules actives sur les bactéries à Gram – ; et de façon intéressante, la meilleure activité du Cx1 est obtenue sur certaines Entérobactéries, *E. coli* ou *K. pneumoniae* par exemple, y compris sur les souches porteuses de BLSE. De plus, si nous comparons le spectre du Cx1 et les CMI obtenues sur l'ensemble des souches, nous sommes comparables à certaines molécules actuellement en développement, que ce soit les peptides antimicrobiens [Chin et al., 2007 ; Chin et al., 2008], ou des molécules à visée antiseptique [Kratzer et al., 2007]. Un des autres inconvénients pourraient être l'effet inoculum, observé plus particulièrement avec *E. coli* ; mais certains antibiotiques (β -lactamines en particulier) présentent également cet effet inoculum, et sont pourtant très utilisés en pratique clinique (hospitalière ou de ville).

Admettons que nous ayons réussi à vendre le concept de molécule innovante (totalement synthétique, de structure inédite, c'est-à-dire totalement différente de ce qui existe actuellement), et prometteuse.

Mais... Quelle est sa cible ?

La 1^{ère} interface entre une molécule et une bactérie, est la paroi bactérienne. La surface de la paroi bactérienne possède une charge globale négative, stabilisée par la présence de cations divalents (Ca^{2+} & Mg^{2+}). La création d'interactions avec des composés cationiques requiert une forte charge positive (pré-organisée), ainsi qu'une partie hydrophobe, permettant à la fois l'attachement à la surface bactérienne et l'intégration dans la membrane externe (ME) et/ou cytoplasmique (MC). L'efficacité de l'interaction dépend alors (bien évidemment) non seulement de la molécule considérée (nombre de charges cationiques, type d'organisation, hydrophobicité) mais aussi de la structure de la paroi bactérienne. L'hypothèse à l'origine du développement du Cx1 est que le calixarène est une plate-forme pouvant servir à organiser des fonctions (quatre fonctions alkyl-guanidinium dans le cas du Cx1), optimisant ainsi l'interaction avec les charges négatives de la paroi bactérienne. De fait, le Cx1 créerait des interactions potentielles avec certaines structures pariétales. Cet effet au niveau pariétal, seul ou associé à d'autres actions intra-cytoplasmiques (inhibition de voie(s) métabolique(s), inhibition de la synthèse des acides nucléiques ou des protéines), serait responsable de l'effet

bactériostatique, voire bactéricide. Très tôt dans ce travail, nous avons souhaité explorer les interactions et effets du Cx1 sur la paroi. Pour cela, nous avons mis en place des techniques innovantes, afin d'appréhender les interactions bactéries/molécules, de différents points de vue, et à différentes échelles. Qu'en est-il à la vue des résultats obtenus ?

Les tous premiers indices sur la cible d'action du Cx1 nous ont été apportés par l'étude du spectre d'activité [Grare et al., 2007a ; Grare et al., 2009a]. En effet, comment expliquer les différences d'activité observées entre les différents genres et espèces étudiées au cours de ce travail ?

Les éléments constitutifs de la paroi et porteurs de charges négatives sont :

- le lipopolysaccharide (LPS) et les phospholipides de la ME chez les bactéries à Gram - ;
- les acides lipoteichoïques (LTA) chez les bactéries à Gram + ;
- les phospholipides de la MC, quelque soit la bactérie considérée.

LPS et LTA sont des structures amphipathiques, hautement variables d'un genre, et d'une espèce à une autre.

Quelle peut être l'influence de la structure et de la composition de la ME sur l'activité du Cx1 ?

La ME est une des structures caractéristiques des bactéries à Gram -, très variable entre les genres bactériens, y compris au sein d'une même famille [Holst, 2007]. La ME peut être une barrière pour les molécules volumineuses et hydrophobes (inactivité de la vancomycine ou des macrolides par exemple) ; le passage des molécules hydrophiles se fait quant à lui par la voie des porines, la voie du LPS, ou par diffusion passive. Divers auteurs ont souligné que la variabilité de composition de la ME, et plus particulièrement du LPS, influence les CMI obtenues pour diverses molécules, les peptides cationiques antibactériens, en particulier [Hasegawa et al., 1997 ; Tattawasart et al., 2000b ; Friedrich et al., 2000]. Le **LPS** est constitué de 3 parties, dont le polysaccharide O, partie externe porteuse de la spécificité antigénique, et le core, partie reliant l'antigène O au lipide A enchâssé dans le peptidoglycane (PG), qui sont deux parties hypervariables. Seul un élément est constant selon les genres et les espèces : un résidu 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosonic acide, liant le core au lipide A [Holst, 2007]. Le core est ensuite constitué de divers éléments : L-glycero-D-manno-heptopyranose (L,D-hep), et divers oligosaccharides dont les substitutions sont la base de la variabilité structurale (L,D-Hep(1→7)- L,D-Hep(1→3)- L-α-D-Hep(1→5)-[α-Kdo-(2→4)]-α-Kdo (Hep III, Hep II, Hep I, Kdo II et

Kdo I, respectivement) (Kdo = résidu 2-keto-3-deoxy-D-manno-octonate). Les substituants sont généralement d'autres sucres ou des résidus phosphate (apport de charges négatives supplémentaires). Rien que chez *Klebsiella pneumoniae*, 3 structures différentes du core ont été décrites ! Des substitutions par des résidus acide galacturonique (GalA) y sont fréquentes. Les charges négatives portées par les résidus GalA sont indispensables à l'intégrité de la ME, leur importance étant la même que les résidus phosphates chez d'autres espèces [Firdich et al., 2005]. La région du core est chargée négativement (groupement phosphoryl, Kdo, acides uroniques), et cette structure contribue à la rigidité de la paroi des bactéries à Gram -, par opposition aux liaisons intermoléculaires cationiques [Firdich et al., 2005]. Par comparaison au LPS des Entérobactéries, qui ne comporte que 6 à 7 groupements phosphate, le LPS de *P. aeruginosa* en contient au moins 10 [Wilkinson, 1983]. De fait, le LPS de *P. aeruginosa*, possède, au pH physiologique, une charge globale négative forte [Hancock, 1984]. La paroi de *P. aeruginosa* possède d'autres particularités (capsule formée d'alginate et autres exopolysaccharides, pili, flagelle, systèmes d'efflux), la rendant naturellement plus résistante aux antibiotiques. Cela expliquerait les CMI plus élevées obtenues pour *P. aeruginosa*, par comparaison à certaines Entérobactéries. **Cette variabilité en terme de composition, et donc d'hydrophobicité et de densité de charges négatives, pourrait influencer sur les interactions avec le Cx1, et expliquerait les variations de la CMI observées selon le genre et l'espèce considérés** [Grare et al., 2009a].

Chez les bactéries à Gram +, pas de membrane externe. Quelles particularités pariétales peuvent être à l'origine d'une variabilité des CMI ?

Les **LTA** sont l'équivalent chez les bactéries à Gram + du LPS chez les bactéries à Gram -. Les LTA sont ancrés dans le peptidoglycane par un diacylglycérol, et possèdent une partie externe polyanionique, 1,3-polyglycérophosphate, partie variable selon les genres et les espèces considérés. Pour *S. aureus*, par exemple, cette partie est constituée d'une répétition de sous-unités DAla- α DNacetylglycosamine. **Qui dit variabilité, dit influence des interactions avec le Cx1, et donc variation des CMI.** D'une manière générale, le Cx1 apparaît plus efficace sur les bactéries à Gram + que sur les bactéries à Gram -. Les interactions avec les LTA seraient peut-être plus fortes et plus nombreuses qu'avec le LPS, à moins que l'absence de ME ne facilite l'action du Cx1 à un niveau plus interne (membrane cytoplasmique, cytoplasme...).

Le LPS et les LTA peuvent donc avoir une influence. Qu'en est-il de l'influence de la composition, de la structure et de l'organisation tridimensionnelle du PG ?

La structure générale du PG est aujourd'hui bien appréhendée. Même si de nouveaux modèles suggèrent une organisation perpendiculaire des chaînes saccharidiques, par rapport à la membrane cytoplasmique, plutôt que parallèle, selon le modèle couramment admis [Vollmer et al., 2004 ; Dmitriev et al., 2005]. La longueur des chaînes saccharidiques n'est pas corrélée à l'épaisseur de la couche de PG (la couche de PG varie entre 20 et 80 nm chez les bactéries à Gram +, contre 2,5 nm en moyenne chez les bactéries à Gram -), et non dépendante de la propriété Gram + ou - des bactéries [Vollmer et al., 2008]. Les chaînes saccharidiques de *Bacillus cereus* compte par exemple entre 50 et 250 unités disaccharidiques, contre en moyenne 3 à 10 unités pour *S. aureus*. Pour les bactéries à Gram -, le nombre d'unités disaccharidiques varie entre 20 et 40 en moyenne (10 à 30 chez *E. coli*, 50 chez *M. morganii*) [Vollmer et al., 2008]. Lors de notre étude du spectre d'activité du Cx1, nous avons obtenu des variations de CMI qui ne semblent pas attribuables à une variation de l'épaisseur du PG ou à la longueur des chaînes (CMI pour *B. cereus*, *S. pyogenes* ou *L. monocytogenes* > CMI sur *S. aureus* par exemple). De plus, la CMI du Cx1 pour *S. aureus* reste identique pour deux souches de VISA (Mu3 et Mu50), possédant une paroi 2 fois plus épaisse que la normale (CMI 4-8 mg/L comme pour la souche de référence *S. aureus* ATCC 29213). Ces souches de VISA ont été très étudiées, et d'autres modifications, en dehors d'une augmentation de l'épaisseur, ont été mises en évidence au niveau de la paroi : augmentation de l'incorporation de GlcNAc, augmentation de l'autolyse et donc du renouvellement du PG, un taux plus important de mucopeptides non aminés (diminution du nombre de charges + : diminution des interactions de type répulsion avec Cx1 ?), diminution du taux de réticulation (maillage moins serré : passage plus facile du Cx1, et atteinte de sa cible plus rapidement ?) [Cui et al., 2006]. Toutes ces modifications ne semblent cependant pas modifier l'activité antibactérienne du Cx1 : malgré l'ensemble des changements structuraux observés chez ces souches, la CMI du Cx1 reste identique à celle obtenue pour les souches de référence, les SASM ou les SARM. **Il n'y aurait donc pas d'influence de l'organisation et de l'épaisseur du PG sur l'activité antibactérienne du Cx1.** A moins que certaines modifications favorables (diminution du nombre de charges positives, maillage moins serré) arrivent à contrebalancer les effets défavorables (augmentation de l'épaisseur du PG)...

Si ce n'est pas la longueur des chaînes saccharidiques du PG, si ce n'est pas l'épaisseur de la paroi, est-ce que la composition et l'organisation des ponts inter-peptidiques peuvent jouer un rôle ?

L'enchaînement disaccharidique (GlcNAc-MurNAc) est peu différent d'une bactérie à une autre, il en est de même pour les 5 acides aminés (aa) constituant le pentapeptide [Vollmer et al., 2008]. Les aa les plus variables sont retrouvés en position 2 (D-isoglutamate chargé négativement chez les bactéries à Gram-), et en position 3 (acide 2,6-diaminopimélique chez les bactéries à Gram- et L-Lys chez les bactéries à Gram+), cela ne modifiant probablement pas la charge globale de surface. Chez les Entérocoques, l'analyse du peptidoglycane pariétal a mis en évidence une muréine composée d'enchaînements Lysine-Aspartate (sauf pour *E. faecalis* qui possède des enchaînements Lysine-Alanine), et contenant des ponts D-Isoasparagine. Cette structure originale du peptidoglycane différencie les Entérocoques des autres Streptocoques et des Lactocoques [Freney et al., 2007]. Cette simple différence d'enchaînements d'aa (i.e. Lys-Ala chez *E. faecalis*, Lys-Asp chez *E. faecium*) pourrait-elle expliquer la différence d'activité du Cx1 obtenue pour ces deux espèces ? Peut-on considérer que la présence de groupements alanine chez *E. faecalis*, pourrait contribuer à la diminution de la charge globale négative de cette souche, expliquant une moindre affinité du Cx1 ? Une meilleure activité a aussi été obtenue sur *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*, et *E. avium*... Il serait intéressant d'évaluer les différences en terme de structure et de charge au sein des ces différentes espèces d'*Enterococcus* spp., afin de mieux appréhender les interactions du Cx1 avec le PG. Le type de pont inter-peptidique est aussi hautement variable entre les souches. La liaison est directe chez la plupart des bactéries à Gram -, alors qu'il existe des ponts inter-peptidiques de 1 à 7 aa chez les bactéries à Gram + [Vollmer et al., 2008]. L'autre différence principale réside dans le taux de liaisons intermoléculaires : 20% chez *E. coli*, contre 93% chez *S. aureus* par exemple [Vollmer et al., 2008]. Cela pourrait expliquer une pénétration plus facile du Cx1 du fait d'un maillage moins serré (mais non observé pour les souches de VISA, comme discuté plus haut), et une meilleure interaction de part la présence de nombreuses fonctions carboxyles nues (chargées négativement).

Reste un point à discuter. Comment expliquer les CMI intéressantes obtenues sur *Mycobacterium chelonae* ?

Ce résultat est cependant à considérer avec beaucoup de précaution, n'ayant été obtenu et observé que sur une seule espèce de Mycobactéries. Sur le plan structural, les mycobactéries se caractérisent par une barrière lipidique très dense à l'extérieur de la cellule. Cette ultrastructure externe est

composée, d'une part, de longues chaînes lipidiques d'acide mycolique et, d'autre part, d'un assortiment de lipides libres plus courts, tels que : le mycocérosate, les glycolipides phénoliques et différents phospholipides. D'autres polysaccharides et glycolipides inhabituels peuvent être retrouvés, pour la plupart spécifiques de l'espèce. Les acides mycoliques de la paroi sont reliés de manière covalente au peptidoglycane par l'intermédiaire de l'arabinogalactane qui constitue une couche intermédiaire. La paroi présente donc une structure unique de type mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane (mAGP). De plus, le lipoarabinomannane (LAM), qui peut être considéré comme le lipopolysaccharide mycobactérien, s'intercale de manière non covalente dans cet enchevêtrement complexe [Kremer et al., 1999]. Concernant les ponts inter-peptidiques, les liaisons de type 3-3, découvertes chez *Mycobacterium* spp. sont rarement rencontrées chez d'autres genres bactériens, sauf en phase stationnaire ou en présence de β -lactamines [Vollmer et al., 2008]. Il est indispensable de tester l'activité sur d'autres Mycobactéries, mais cela implique des difficultés d'ordre technique pour les Mycobactéries à croissance lente comme *M. tuberculosis* (inclusion du Cx1 dans la gélose du milieu Löwenstein-Jensen, et donc problèmes de stabilité et de dégradation). Cela pourrait être une des perspectives de ce travail.

En conclusion, il semble que l'ensemble de ces facteurs de variation, d'une souche à une autre, modifient les interactions possiblement créées par le Cx1. Une des cibles serait donc pariétale...

Le 2^{ème} indice nous a été fourni par les courbes de bactéricidie. Que nous apprend le type d'activité observé pour le Cx1 ?

La réduction rapide de l'inoculum bactérien observée en présence de Cx1 est une des caractéristiques des molécules dites « perméabilisants membranaires » ; et il a été montré que la capacité « bactéricide » de ces composés est moins prononcée que d'autres (effet transitoire aux concentrations sub-bactéricides). Cette perméabilisation membranaire est généralement créée par l'intermédiaire de la formation de pores transitoires, ou d'autres altérations (création de domaines, déplacement de charges), et une partie de la population peut échapper à ce phénomène (effet concentration dépendant) [Pag et al., 2004]. Les profils de courbe obtenus pour les différentes souches testées, peuvent indiquer que, fonction de l'espèce bactérienne, et de la concentration en

Cx1, une effet initial de type « membrane-based killing » pourrait être combiné à d'autres effets expliquant la bactéricidie rapide ; et qu'à des concentrations plus faibles, seul l'effet membranaire est obtenu, entraînant une activité « sub-léthale » (ralentissement de la croissance bactérienne). La perméabilité membranaire, mesurée dans notre étude, par utilisation de deux fluorochromes, capables ou non de traverser la membrane bactérienne intacte, apparaît seulement partiellement ou transitoirement modifiée en présence de Cx1 (marquage comparable au témoin après un certain délai, aux concentrations sub-bactéricides). Mais il a été montré pour d'autres molécules, comme les peptides cationiques antimicrobiens, qu'il n'existait pas de corrélation entre la capacité de ces molécules à perméabiliser la membrane, et l'activité antibactérienne [Wu et al., 1999]. Le Cx1 semble donc bien avoir une ou des cibles pariétales, l'effet obtenu conduisant à une altération de la perméabilité membranaire.

Si la cible est réellement la paroi, et que des interactions de type charge à charge, ou hydrogène, ou autres, peuvent se créer, pouvons-nous mettre en évidence ces interactions, ou des altérations dans la structure pariétale ?

Les techniques permettant d'appréhender les effets sur la paroi bactérienne sont peu nombreuses, et souvent difficiles à mettre en œuvre. Certaines techniques, physico-chimiques, sont loin des préoccupations biologiques et thérapeutiques ; nous citerons par exemple l'estimation : (i) de l'hydrophobicité de surface par mesure d'angle de contact, ou test MATS (« Microbial Adhesion To Solvents »), ou (ii) de l'efficacité d'adhésion de bactéries à différents substrats. La mesure du potentiel zêta par la technique de la microélectrophorèse reste peu utilisée ; et les modifications de la mobilité électrophorétique en présence de composés antibactériens n'ont jamais, à notre connaissance, été évaluées. Cette technique est pourtant utilisée pour distinguer les propriétés de surface de différents genres bactériens, ou de différentes souches porteuses de structures extra-membranaires (pili, flagelles) variables [Sonohara et al., 1995 ; Bos et al., 1998 ; Morisaki et al., 1999]. Un des outils les plus utilisés en microbiologie, reste la microscopie électronique à transmission (MET). Mais, pour les échantillons biologiques instables et hydratés, les préparations préalables nécessitent des étapes de fixation et d'inclusion, ou l'utilisation d'une méthode de cryofixation. La structure est immobilisée, dans un état assez lointain de son état natif, vivant et hydraté. La MET permet de mettre en évidence les effets de molécules antibactériennes sur la paroi, mais elle est longue, coûteuse, et il est souvent

difficile de savoir si les effets observés sont ou non dus à des artefacts liés à la préparation. Malgré des progrès méthodologiques, la microscopie électronique est limitée à des conditions d'observation ex situ. Dans ce contexte, la microscopie à force atomique (AFM : « Atomic Force Microscopy »), découverte par Binnig et coll. en 1986 [Binnig et al., 1986], se présente vraisemblablement comme la méthode la plus adaptée pour étudier les bactéries en milieu aqueux et ce avec une résolution de l'ordre du nanomètre/newton. En particulier, cette microscopie permet d'imager et quantifier les propriétés de surface et les interactions à la surface des bactéries. Cette technique reste cependant encore assez confidentielle, en microbiologie ; et à l'origine de ce travail, aucune équipe, à notre connaissance, n'utilisait cette technique, en milieu aqueux, pour évaluer les effets d'agents antibactériens sur la paroi bactérienne. En mode image, cette technique permet de visualiser les nanostructures de surface des bactéries (flagelles, pili), incluant les changements morphologiques de la membrane bactérienne lors de processus physiologiques : changements morphologiques de la paroi de *Staphylococcus aureus* lors de la division cellulaire [Touhami et al., 2004], étude de la structure des pili de *Pseudomonas aeruginosa* avec une haute résolution [Touhami et al., 2006]. Cette technique peut aussi permettre de visualiser les altérations des parois bactériennes suite à un traitement antibactérien. Certains auteurs ont utilisé cette technique pour visualiser l'effet de molécules antibiotiques sur la paroi des cellules ; mais ces études ont été réalisées à l'air, après fixation [Braga et al., 1997 ; Braga et al., 1998 ; Braga et al., 2002a ; Braga et al., 2002b ; Braga et al., 2003 ; Meincken et al., 2005 ; Chen et al., 2006 ; Li et al., 2007]. L'effet d'antibiotiques, mais aussi d'antibactériens en cours d'évaluation (peptides antibactériens) a ainsi été exploré par AFM [Shaw et al., 2006 ; Tian et al., 2006]. Cependant, les études réalisées avec des méthodes d'immobilisation par séchage à l'air ou par fixation au glutaraldéhyde sont à considérer avec beaucoup de précautions compte tenu du caractère très dénaturant de ces méthodes préparatives. En effet, même si ces études montrent des effets significatifs (formation de pores, lyse) sur différents systèmes bactériens (ex : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*...), il est très difficile d'occulter les artefacts dus à la préparation des échantillons. Des méthodes alternatives ont été développées permettant d'immobiliser les cellules soit sur des supports positifs, soit dans les pores d'une membrane poreuse puis de réaliser des images directement en solution [Touhami et al., 2004 ; Touhami et al., 2006 ; Verbelen et al., 2006 ; Francius et al., 2008]. Depuis ces innovations, deux études ont été réalisées in situ en solution en immobilisant les bactéries dans les pores d'une

membrane afin d'observer les effets de molécules antibiotiques (isoniazide, streptomycine et éthambutol) sur *Mycobacterium bovis* [Verbelen et al., 2006 ; Alsteens et al., 2008]. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence l'augmentation de la rugosité de surface des bactéries associée à l'apparition de stries suivant la concentration des molécules.

Partant de ce constat, nous avons exploré le potentiel de techniques « atypiques » en microbiologie, et surtout leur application à l'identification de la ou des cibles d'action de nouvelles molécules antibactériennes. Notre objectif était d'évaluer la capacité de l'AFM, en milieu aqueux (i.e. sur des bactéries vivantes, hydratées) à mettre en évidence des altérations de la paroi bactérienne suite au traitement par des antibactériens. Combiner cette technique à la microélectrophorèse, nous permet de confronter des données obtenues à différentes échelles (nanométrique et micrométrique), et d'appréhender au plus près les effets du Cx1 sur la paroi de différentes souches. Premièrement, ces deux techniques, combinées ou non, présentent une sensibilité suffisante pour la différenciation des propriétés pariétales de différents genres bactériens : mobilité électrophorétique supérieure pour *E. faecalis* par exemple, ou rigidité supérieure de *E. coli* par comparaison à *P. aeruginosa*. La place de ces deux techniques en microbiologie est certaine, pour la distinction des genres ou espèces, tout en donnant des informations sur les propriétés de surface et de pression osmotique des bactéries. Deuxièmement, in situ, en milieu aqueux (KNO_3 , à 0,1 M), sur bactéries vivantes (bactéries recultivables après immobilisation sur la lame de verre recouverte de PEI), telles *P. aeruginosa*, l'AFM nous a permis de montrer, en présence de Cx1 :

- (i) l'existence de brèches dans la paroi de *P. aeruginosa* (aucune modification n'est observée avec l'hexamidine ou le mCx1) ;
- (ii) une augmentation la sensibilité des bactéries au passage de la pointe (modification des propriétés membranaires ? modification des propriétés d'adhésion à une surface chargée positivement ?) ;
- (iii) une augmentation de la rigidité bactérienne (augmentation de la pression osmotique). Cette augmentation de pression osmotique pourrait s'expliquer par une altération de la perméabilité membranaire et une modification du contenu intracellulaire (apport d'eau) ;

Résultats concordants à ceux obtenus en microélectrophorèse : diminution significative de la mobilité électrophorétique de *P. aeruginosa*, avec un effet concentration dépendant. Cette diminution est le

signe d'une augmentation très significative du caractère perméable des parois en présence de cette molécule et/ou une adsorption spécifique des calixarènes en surface des bactéries.

Il semble donc, à la vue de ces résultats, que le Cx1 entraîne une modification des propriétés de surface (densité de charge, souplesse hydrodynamique), avec réorganisation et/ou déstabilisation de la membrane, associée à une possible création de domaines et/ou de pores, et que cela influence les propriétés de perméabilité, et d'adhésion des bactéries... ceci uniquement chez *P. aeruginosa*. Les résultats de microélectrophorèse obtenus pour *E. coli*, *S. aureus* et *E. faecalis* ne nous ont pas permis de mettre en évidence une modification du profil de mobilité électrophorétique, quelque soit la molécule testée. Concernant l'AFM, nous avons rencontré des difficultés d'adhésion de *E. coli* et *E. faecalis* sur les lames de verre recouvertes de PEI, ce qui ne nous a hélas pas permis de mener plus avant nos investigations ; l'absence d'effet obtenu par la méthode de microélectrophorèse n'a pas pu être confirmé par AFM, et la question d'un effet pariétal sur ces autres souches reste entière. Les modifications observées chez *P. aeruginosa* suite au traitement par le Cx1 sont-elles différentes chez les autres souches ? Les techniques utilisées dans ce travail, sont-elles insuffisamment sensibles pour mettre en évidence l'influence du Cx1 sur les propriétés de surface des autres souches ? En conséquence, il est indispensable de continuer l'évaluation de ces techniques, et de reproduire les données obtenues, afin de confirmer l'intérêt de l'AFM et de la microélectrophorèse dans l'évaluation de la cible de nouveaux antibactériens. L'originalité et l'intérêt de cette association tient au fait que l'étude se réalise à deux échelles (micrométrique et nanométrique), et que les informations apportées sont complémentaires. Une des perspectives de ce travail, serait d'évaluer les interactions entre le Cx1 et des modèles de membranes phospholipidiques, ou de paroi bactérienne [Tian et al., 2006]. Il serait ainsi possible (peut-être) de visualiser à l'échelle nanométrique les interactions créées par le Cx1. Des auteurs ont ainsi déjà étudié les interactions entre des nanoparticules constituées de calixarènes et des gels matrices, et ont montré que l'AFM est capable d'imager l'organisation des calixarènes dans ces gels [Shagaldian et al., 2003]. D'autres ont montré que les perturbations créées par l'azithromycine ou l'indolicidine dépendent de la nature des lipides présents dans la membrane [Berquand et al., 2004 ; Shaw et al., 2006].

A ce stade de l'étude, nous commençons à entrevoir l'étendue de l'intérêt et des applications du Cx1. Nous avons entre nos mains une molécule active, non toxique, dont une des cibles semblaient être

pariétale. Comment pouvons nous confirmer cette première impression ? Comment confirmer une éventuelle désorganisation de la membrane et/ou de la paroi ?

L'éventuelle désorganisation membranaire créée par le Cx1 peut-elle conduire à une modification de la perméabilité membranaire ?

Modification de la perméabilité, implique modification de l'entrée et/ou de la sortie de molécules ; une des techniques applicable à la mise en évidence de cet effet est l'utilisation de marqueurs capables ou non de pénétrer la membrane intacte (SYTO9 et IP choisis dans notre étude). Des profils différents d'altération de la perméabilité membranaire peuvent être obtenus par cytométrie en flux (CMF), selon le mécanisme d'action de la molécule considérée. Ainsi, l'amoxicilline entraîne une altération importante de la perméabilité membranaire, avec pénétration facilitée de l'IP. L'amoxicilline agit par inhibition du processus de transpeptidation, étape nécessaire à la constitution du maillage du PG, par inactivation de certaines PLP (PLP1 & PLP3). Cela induit une altération progressive de l'intégrité membranaire, parfaitement observable par association CMF & marquage par des fluorochromes. La gentamicine entraîne une atteinte membranaire moindre ; l'inhibition de la synthèse des protéines a un effet indirect et tardif sur l'intégrité membranaire, par comparaison à l'amoxicilline qui inhibe précocement la synthèse du PG. Les deux marquages diminuent au delà-de la CMI, que ce soit pour l'amoxicilline ou la gentamicine ; ce sont tous deux des antibiotiques bactéricides.

Ces profils étant définis, cette technique est-elle assez sensible pour être appliquée à l'analyse de « nouveaux » antibactériens ? Aucune modification n'est obtenue avec la chlorhexidine ; cela implique une absence d'effet de la CHX sur la perméabilité membranaire, effet en tout cas non appréhendable par la technique utilisée dans notre étude. Le profil observé en présence de Cx1 est quant à lui totalement différent de celui des autres molécules : augmentation continue et progressive, dose dépendante, des fluorescences SYTO9 et IP. Ce profil se rapproche de celui de l'amoxicilline, tout en étant différent ; l'effet du Cx1 serait donc pariétal, mais sur une cible différente de celle de l'amoxicilline. Le Cx1 est la seule molécule pour laquelle nous obtenons une fluorescence SYTO9 intense, prolongée et croissante avec la concentration en Cx1. L'effet « lyse bactérienne » à des concentrations au delà de la CMI, comme observé pour l'amoxicilline et la gentamicine, n'est pas observé ici. **Le Cx1 agirait donc bien au niveau pariétal, cette interaction aboutissant à une modification de la perméabilité membranaire**, sans que cette altération n'entraîne (à elle seule ?) la mort bactérienne, aux concentrations testées.

Va pour une cible pariétale... mais laquelle ? Qu'en est-il de la capacité du Cx1 à interagir avec des structures telles que le LPS ou les LTA ?

L'évaluation *in vitro* a montré la capacité du Cx1 à se lier à différents types de LPS (*E. coli* O55:B5, et *P. aeruginosa*), et aux LTA (*S. aureus*), avec une affinité forte (déplacement de la polymyxine). L'effet est rapide (< 5 min d'incubation), dès de faibles concentrations en Cx1. L'effet est proportionnel à la concentration, et l'effet maximal n'est pas obtenu pour la concentration équivalente à la CMI (concentration <<< à la CMI pour *P. aeruginosa*). Que nous apportent ces informations ?

Il a été montré que la capacité des antibactériens cationiques à pénétrer la membrane externe, était liée à des interactions avec le LPS, au niveau du lipide A, cette interaction perturbant les liaisons LPS-LPS, et déstabilisant ainsi la structure de la membrane externe [Hancock, 1984 ; Nikaido & Vaara, 1985]. Certains antibiotiques cationiques, tels que les polymyxines et les aminosides, ont une capacité à augmenter la perméabilité de la membrane externe au lysozyme, ou à d'autres composés hydrophobes [Hancock et al., 1981]. Ces composés interagissent ou déstabilisent les parois bactériennes, et des études de relations structure-activité ont déjà montré un lien entre l'activité antibactérienne, et un effet dit « anti-endotoxine », par séquestration du LPS et/ou du LTA [Scott et al., 1999 ; Zorko & Jerala, 2008 ; Sharma et al., 2009 ; Warshakoon et al., 2009 ; Wu et al., 2009]. Le Cx1 posséderait de telles propriétés, expliquant (peut-être) les profils de bactéricidie observés.

Cette liaison aux structures pariétales externes des bactéries est-elle la cible principale, ou une des cibles du Cx1 ? Le décalage CMI/effet maximal semble plutôt plaider en faveur du 2^{ème} postulat, comme souligné précédemment pour d'autres molécules [Scott et al., 1999]. En quoi cette interaction est-elle alors intéressante ? Pour les peptides cationiques capables de se lier au LPS et/ou aux LTA, il a été montré que ce mécanisme n'est pas responsable de la bactéricidie, mais se traduit par une inhibition de la réponse inflammatoire LPS et LTA dépendante [Scott et al., 1999]. L'alexidine et la chlorhexidine (molécule de référence choisie dans notre étude) possèdent aussi cette propriété : la CHX prévient l'activation des macrophages et supprime la réponse inflammatoire induite par les bactéries par l'intermédiaire des récepteurs TLRs [Zorko & Jerala, 2008]. Cette capacité peut être utilisée afin de prévenir la réaction inflammatoire induite par le LPS et/ou le LTA lors d'une infection [Scott et al., 1999]. En effet, les LTA auraient un rôle d'endotoxine, comme le LPS, et il a été montré que la présence de LTA et/ou de LPS stimule la production de médiateurs pro-inflammatoires (TNF α , IL1 β , IL6, IL10), et induit le relargage d'autres médiateurs (MCP-1, CCL5-RANTES, IL8, CXCL10)

[Deininger et al., 2003 ; Kimbrell et al., 2008]. Cet effet est majoré en présence d'antibiotiques bactéricides (β -lactamines en particulier), qui accentuent le relargage de LPS et de LTA par lyse bactérienne. Si l'on envisage une telle action « anti-inflammatoire » ou « anti-endotoxine » pour le Cx1, reflet de la capacité à séquestrer LPS et LTA, le Cx1 présenterait donc un intérêt dans la prévention du sepsis, lors d'infections causées par des bactéries à Gram - ou à Gram+, seul, ou en association avec d'autres antibiotiques, susceptibles d'accentuer la réponse inflammatoire. L'évaluation de la capacité du Cx1 à bloquer l'induction par le LPS et/ou le LTA, de la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, est une des perspectives de ce travail.

Ainsi, ces différents arguments confirment l'hypothèse initiale : le Cx1 interagirait avec certaines structures externes de la bactérie (LPS, LTA), et induirait des déstabilisations de la paroi, et une modification de sa perméabilité. D'autres molécules (polymyxines ou autres perméabilisants membranaires), sont de très bons adjuvants en chimiothérapie antibactérienne, parce qu'elles améliorent la pénétration et l'action d'autres antibiotiques, par déstabilisation de l'organisation membranaire [Li et al., 1999 ; Schmidt et al., 2001 ; Vaara et al., 2008].

Peut-on observer des interactions synergiques antibiotique-Cx1 ?

Le Cx1 possède une activité synergique ou additive avec un nombre certain d'antibiotiques (de familles diverses), quelque soit la bactérie considérée. Aucun antagonisme n'a été observé. Les interactions synergiques varient selon les souches testées, et aucune règle générale ne peut être dégagée pour une espèce donnée, et une combinaison antibiotique-Cx1 donnée. Le mécanisme exact de l'effet synergique est encore très mal connu ; nous avons observé à la fois une augmentation de l'activité des antibiotiques avec une activité inchangée du Cx1, et l'inverse. Dans quelques cas, une activité supérieure était obtenue pour les deux molécules utilisées en association. L'hypothèse suivante peut être formulée : la désorganisation membranaire créée par le Cx1 peut augmenter l'activité des antibiotiques, en favorisant leur accessibilité à leur cible, qu'elle soit pariétale (β -lactamines), cytoplasmique (fosfomycine) ou intracellulaire (aminosides, fluoroquinolones).

Pour *E. coli* ATCC 25922, une synergie a été observée avec : gentamicine, tobramycine et rifampicine. Pour les 3 isolats cliniques étudiés (porteurs respectivement d'une pénicillinase bas niveau, d'une céphalosporinase hyperproduite, et d'une BLSE de type CTX-M), nous avons constaté

la disparition de la synergie avec la tobramycine (seules 2 souches sur les 3 sont résistantes), avec apparition d'une synergie avec le céfotaxime pour EcR3 (diminution de 4 dilutions de la CMI du céfotaxime et du Cx1), cette souche étant la seule présentant une résistance au céfotaxime. Il semblerait donc que, dans certains cas, le Cx1 soit capable de « restaurer » l'activité d'antibiotiques auxquels la bactérie était devenue résistante. Comment expliquer ce phénomène ? Il a été démontré, pour les peptides cationiques amphiphiles, qu'ils entraînaient aussi une dégradation du peptidoglycane, et augmentait l'activité des β -lactamines, par augmentation de l'activité des muréines hydrolases [Sahl & Bierbaum, 1998]. D'autres peptides cationiques entrent en compétition avec les cations divalents, responsables de la stabilisation du LPS, ce qui résulte en une perméabilisation de la membrane externe et facilite l'accès aux sites de synthèse du PG [Vaara, 1996]. Ces deux mécanismes seraient envisageables avec le Cx1, cela reste à confirmer.

Concernant *S. aureus* ATCC 29213, une synergie est obtenue avec : streptomycine et tigécycline (antibiotiques inhibant la synthèse des protéines par interaction avec la sous-unité 30S des ribosomes), acide fusidique (inhibant la synthèse des acides nucléiques), fosfomycine (inhibition des 1^{ères} phases de la synthèse du PG). Tous ces antibiotiques nécessitent pour leur action, une traversée du PG et de la membrane cytoplasmique. Nous revenons donc à notre 1^{ère} hypothèse : la déstabilisation de la paroi par le Cx1 et un accès facilité à leur cible pour ces antibiotiques. Si nous considérons les 3 isolats cliniques étudiés (résistance à la méticilline $\pm$ résistance à la tobramycine/kanamycine $\pm$ résistance de type MLS_B), nous avons constaté, de façon similaire à ce qui a été obtenu pour *E. coli*, une disparition de la synergie avec la streptomycine, et l'apparition de synergies avec la pénicilline G (diminution de 4 dilutions de la CMI du Cx1, et de 8 pour la pénicilline G), l'imipénème et la gentamicine. Là encore, il n'existe donc pas *a priori* de synergie spontanée avec les β -lactamines pour les souches de référence, mais apparition de ce que nous pourrions considérer comme une « restauration de l'activité » quand les souches sont résistantes.

P. aeruginosa ATCC 27853 est la souche pour laquelle nous avons obtenu le plus d'interactions de type synergie avec le Cx1 : β -lactamines (pipéracilline-tazobactam, ceftazidime), fosfomycine, rifampicine, ciprofloxacine (inhibition des topoisomérases et donc de la synthèse des acides nucléiques), tobramycine. Une synergie est obtenue quelle que soit la cible d'action de ces antibiotiques, avec, en particulier, une synergie « native » avec les β -lactamines. Pour PaR3 et PaR5, une synergie avec la colimycine (déstabilisation de la membrane cytoplasmique) a été obtenue. Au

delà d'une déstabilisation pariétale permettant un accès facilité à leurs cibles, le Cx1 pourrait avoir une action coordonnée avec les antibiotiques agissant sur la paroi, par interactions sur un ou des cibles pariétales différentes, expliquant une fragilisation plus efficace de la paroi protectrice des bactéries, et donc une efficacité accrue.

Si l'on considère l'ensemble des souches testées, une synergie n'est pas obtenue systématiquement avec tous les aminosides testés, tout est fonction de la souche considérée (Tableau XIV). Les aminosides ont tendance à se comporter comme des polycations. Cette particularité leur permet de se concentrer au niveau de l'environnement immédiat des bactéries, par interactions électrostatiques avec la paroi chargée négativement. Chez les bactéries à Gram -, cette concentration rapide et importante à la surface des bactéries, permet *de facto* une pénétration rapide des aminosides par la voie des porines. Nous pourrions imaginer, par exemple, que l'action coordonnée de deux types de molécules fortement chargées positivement (aminosides et Cx1), au niveau de la paroi bactérienne chargée négativement, pourrait créer une désorganisation plus efficace et ainsi offrir un passage facilité à l'une et/ou l'autre des molécules.

Tableau XIV : Interactions obtenues avec les aminosides en fonction des souches testées.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Synergie	Gentamicine Tobramycine	Gentamicine Streptomycine	Tobramycine
Absence de synergie	Amikacine	Perte de synergie pour les isolats cliniques	Amikacine

Aucune synergie n'est jamais obtenue avec l'amikacine, et le type d'interaction est très variable d'une souche à l'autre : y aurait-il une influence de la structure de l'aminoside ? Les aminosides ne possèdent pas tous le même nombre de fonction NH_2 (charge positive potentielle) et de fonction OH (charge négative potentielle). Cet équilibre de charge peut-il expliquer une interaction plus ou moins forte avec la paroi bactérienne chargée négativement ? Et en ce cas, expliquer des interactions différentes avec le Cx1 ? Si l'on regarde attentivement les structures chimiques des aminosides étudiés ici, les différences suivantes peuvent être notées (Tableau XV) :

Tableau XV : Comparaison des structures des aminosides étudiés.

	Amikacine	Gentamicine	Streptomycine	Tobramycine
Groupements NH ₂	4	4	4 Fonction guanidine	5
Groupements OH	6	3	8	5
Nombre de cycles	3	3	3	3
Chaîne latérale	Oui	Oui	Non	Non

Pour *E. coli*, la synergie obtenue avec la gentamicine est supérieure à celle obtenue avec la tobramycine ; pour *S. aureus*, la même constatation est effectuée entre la gentamicine et la streptomycine. Concernant, *P. aeruginosa*, seule une synergie (FIC très faibles) avec la tobramycine a été observée. Gentamicine et tobramycine présentent un meilleur équilibre de charges + et – potentielles ; amikacine et streptomycine portant une charge négative plus importante. La particularité de la streptomycine réside en le regroupement des charges positives sur un seul cycle, sous forme de fonction guanidine. Ces différences ne semblent pas suffisantes pour expliquer le type d'interaction obtenue avec le Cx1. Peut être faudrait-il se placer à un niveau plus global, de structure de molécule dans son ensemble, et d'organisation spatiale... ?

Concernant les fluoroquinolones (FQ), une interaction de type synergie ou additivité a été obtenue uniquement pour la ciprofloxacine, avec *P. aeruginosa*. Il a été montré que chez les bactéries à Gram -, les FQ hydrophiles (norfloxacine, ciprofloxacine), empruntent la voie des porines. Quant aux molécules hydrophobes (péfloxacine, ofloxacine, moxifloxacine, lévofloxacine), elles passent par la voie du LPS, après chélation des ions Mg²⁺. Il est difficile sur ces simples données, de comprendre le type d'interactions créées par le Cx1 avec les FQ ; nous aurions pu imaginer que les liens créés avec le LPS, et/ou la désorganisation membranaire supposée en présence de Cx1, pourraient favoriser le passage de l'ensemble des FQ. Si l'on considère les propriétés complexantes décrites pour certains calixarènes, pouvons nous envisager une chélation des ions Mg²⁺, et une concurrence avec les FQ au niveau du LPS ? Aucun antagonisme n'a pourtant été observé. A l'inverse, une chélation des ions Mg²⁺ par les FQ, pourrait faciliter l'accès du Cx1 à sa ou ses cibles (LPS par exemple), favoriser son action et donc une éventuelle déstabilisation membranaire meilleure, expliquant la synergie d'action observée. Sans réelle donnée sur la cible du Cx1, il est difficile cependant, de proposer une explication réellement probante...

Enfin, la synergie observée entre le Cx1 et la tigécycline sur *S. aureus* pose aussi question, et irait un peu dans le même sens. Les tétracyclines sont des molécules connues pour leur pouvoir chélatant des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} : pénétration dans les bactéries par la voie des porines sous forme complexée à Mg^{2+} , interférence avec les systèmes enzymatiques de la bactérie par un mécanisme de complexation ionique (Mg^{2+} en particulier). Là aussi l'accès à la cible du Cx1 pourrait être facilitée, entraînant une désorganisation membranaire plus efficace, et favorisant l'entrée de la tigécycline.

En conclusion, il existe trois constantes pour l'ensemble des souches testées :

- (i) une absence d'antagonisme ;
- (ii) une synergie avec la rifampicine et les aminosides ;
- (iii) l'obtention d'une « restauration de l'activité » des β -lactamines chez les isolats cliniques.

Dans la littérature, de nombreuses études soulignent l'absence d'activité propre de certaines molécules, mais leur capacité conjointe à améliorer la pénétration et/ou l'activité d'autres molécules antibactériennes [Vaara, 1992 ; Vaara et al., 2008]. Alors que la membrane externe protège les bactéries à Gram – contre de nombreux agents, il est possible de la fragiliser par addition de molécules (perméabilisants membranaires dont nous avons discuté précédemment), qui vont être capables de désorganiser le LPS, et ainsi d'augmenter la perméabilité membranaire [Alakomi et al., 2006]. L'exemple le plus classique est l'EDTA qui séquestre les cations divalents, qui normalement contribuent à la stabilité de la ME en créant des interactions électrostatiques entre les protéines et le LPS. Le polyéthylène imine (PEI), molécule aliphatique basique, possède un effet perméabilisant fort, sans toutefois d'effet bactéricide sur les bactéries à Gram – [Helander et al., 1997]. Différentes études ont montré que l'utilisation du PEI à faible concentration (250 nM), permet d'améliorer l'activité de différents antibiotiques hydrophobes (érythromycine, novobiocine, rifampicine, clindamycine ou acide fusidique) sur *E. coli*, *P. aeruginosa* ou *S. enterica* [Helander et al., 1997]. D'autres essais menés sur un isolat clinique multirésistant de *P. aeruginosa* ont montré une synergie (diminution de la CMI de 1,5 à 56 fois) avec la ceftazidime, le chloramphénicol, la norfloxacine... et un antagonisme (augmentation de la CMI de 1,2 à 5 fois) avec les aminosides, les polymyxines ou la vancomycine [Khalil et al., 2008]. D'autres essais menés sur des dérivés de la polymyxine, mais ne possédant que 3 charges positives (contre 5 pour la molécule native), ont montré que ces composés ne possèdent aucune activité antibactérienne propre, mais présentent une activité synergique avec de nombreux

antibiotiques, normalement exclus par la membrane externe des bactéries à Gram – [Vaara et al., 2008]. Par la méthode de l'échiquier, ces auteurs ont souligné une activité synergique sur *Acinetobacter baumannii* (clarithromycine, rifampicine, vancomycine, acide fusidique, méropénème), sur certaines Enterobactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae*, avec rifampicine, mupirocine, érythromycine, azithromycine) ; les interactions de type synergie restant cependant très peu nombreuses avec *P. aeruginosa* (uniquement avec la clarithromycine). Par comparaison à d'autres molécules, le Cx1 possède un panel d'interactions de type synergie relativement large, et particulièrement intéressant sur *P. aeruginosa*. Il est très difficile de comparer notre étude à d'autres, les antibiotiques (classe et concentration) et les souches bactériennes étant différentes. Cependant, nos résultats sont au moins équivalents à d'autres publiés dans la littérature. Il serait intéressant de poursuivre notre étude d'interactions avec des antibiotiques hydrophobes et volumineux, normalement exclus de la ME, afin de savoir si la déstabilisation membranaire créée par le Cx1 est suffisante pour ouvrir le passage à ces molécules.

Cela confirme le potentiel de notre molécule en tant que nouvel adjuvant de chimiothérapie anti-infectieuse. En l'absence de données pré-cliniques, *in vivo* chez l'animal, sur la toxicité du Cx1, et sur ses profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, il est difficile de prédire quel pourra être l'avenir de ce composé. Cependant, les données *in vitro*, accumulées au cours de notre étude, nous ont ouvert un large éventail de possibilités à notre molécule... active, non toxique, à cible probablement pariétale... cela implique un avantage supplémentaire ! En effet, l'intérêt de développer des composés actifs sur la membrane ou la paroi bactérienne, est que le risque d'apparition de mutants résistants est relativement faible, car cela impliquerait des modifications en profondeur de la paroi (mutation de nombreux gènes, altérations délétères à la survie de la bactérie).

Le Cx1 est-il capable de sélectionner des mutants résistants ?

Aucune sélection de mutants résistants n'a été mise en évidence pour *S. aureus* ATCC 29213 et *P. aeruginosa* ATCC 27853. La sélection de mutants résistants chez *E. coli* ATCC 25922, nécessite un nombre important de passages (> P15). Après 5 ou 10 passages, et arrêt de la pression de sélection, la CMI revient à sa valeur initiale. Les mutants obtenus au delà de 15 passages sont stables : absence de retour à la CMI initiale. La population globale apparaissait plus hétérogène en terme de

taille et de structure, avec la présence de formes filamenteuses, témoins d'une probable induction du système SOS (ou levée de l'inhibition par le répresseur LexA), ou d'une inhibition des gènes impliqués dans la scissiparité. Le profil de sensibilité aux antibiotiques reste identique, à l'exception de la céfalotine, céfoxitine, nitrofurantoïne et de la fosfomycine (perte d'une ou deux dilutions en terme de CMI). Comment expliquer l'apparition de ces mutants ?

Si l'on prend l'exemple des FQ, leur particularité est le faible niveau de résistance généré *in vivo* (hormis le mécanisme médié par les gènes *qnr* mis en évidence récemment). La résistance clinique à un antibiotique nécessite 3 à 5 mutations de résistance indépendantes. Cela montre bien que les mutations qui confèrent la résistance à la ciprofloxacine, ne sont pas simplement le résultat d'erreurs qui surviennent lors de la réplication du génome, mais sont induites par la dé-répression de protéines qui agissent comme des amplificateurs du taux de mutation. La ciprofloxacine a été décrite par divers auteurs comme capable d'induire le système SOS, induction impliquée dans la génération de mutations de résistance [Cirz et al., 2005]. Quel est le mécanisme ?

La ciprofloxacine induit des lésions à l'ADN (coupures double brin après formation d'un complexe ADN-gyrase-ciprofloxacine), qui peuvent être prises en charge par différents systèmes de réparation. Un de ces systèmes conduit à la formation de les filaments RecA-ssDNA qui se lient sur le répresseur LexA, et démasquent son site à activité auto-protéolytique. Le clivage de LexA lève la répression de plus d'une trentaine de gènes, codant des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire et la multiplication bactérienne. Une diminution suffisante de la concentration en LexA résulte en la transcription des gènes codant les polymérases Pol II (*polB*), Pol IV (*dinB*) et Pol V (*umuD* et *umuC*), qui sont des ADN polymérases non essentielles, mais hautement impliquées dans la création de mutations en réponse à des dommages à l'ADN (transcription infidèle) [Cirz et al., 2005]. Comme la ciprofloxacine induit les voies de réparation de l'ADN, la molécule en elle-même est responsable de l'apparition de mutations de résistance. De façon très intéressante, il a été montré dans des modèles d'infection *in vivo*, que l'inhibition du clivage de LexA prévient la survenue de mutations induites par la ciprofloxacine ou la rifampicine [Cirz et al., 2005]. De nombreux autres antibiotiques ont montré une capacité à induire le système SOS, conduisant à l'apparition de mutations de résistance *in vivo* et *in vitro* : fluoroquinolones, rifamycines, triméthoprim, mais aussi β -lactamines. Les gènes impliqués dans le système SOS commencent à être bien connus et caractérisés : 43 gènes chez *E. coli*, 63 chez *B. subtilis* (dont 7 seulement en commun avec *E. coli*),

16 gènes chez *S. aureus* et 15 gènes chez *P. aeruginosa* [Cirz et al., 2006 ; Cirz et al., 2007]. Dans tous les cas, LexA contrôle l'expression des gènes *recA*, *lexA*, et de nombreux autres gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, et codant des polymérases non essentielles.

Mais comment les β -lactamines peuvent-elles induire la stimulation du système SOS alors qu'elles n'induisent pas (directement) des dommages à l'ADN ? Chez *E. coli*, les β -lactamines seraient un stimulus, pour un système de transduction du signal à deux composants, entraînant une induction du système SOS. Cela induit un arrêt temporaire de la multiplication bactérienne, et un arrêt de la division cellulaire, afin de permettre la survie en présence de concentrations létales de β -lactamines. Miller et coll., ont montré que ce système est induit lors d'une exposition à l'ampicilline, la pénicilline, le céfuroxane, la céphalexine et la pipéracilline. Le stimulus à l'origine de l'activation de ce système serait la liaison de la β -lactamine à certaines PLPs (en particulier la PLP3) [Miller et al., 2004]. La PLP3 est codée par le gène *ftsI*, appartenant à une famille de gènes impliqués dans la filamentation en réponse à une modification de la température lors de la division cellulaire : la PLP3 est une des transpeptidases impliquées dans la synthèse du PG lors de la septation. L'inactivation de la PLP3 crée un signal au niveau d'un système de transduction du signal à deux composants, induisant l'activation de toute une série de gènes dont *sfiA*, codant une protéine prévenant la polymérisation de FtsZ : il en résulte une inhibition de la division cellulaire, parallèlement à une activation du système SOS [Miller et al., 2004].

Comment le Cx1 pourrait-il induire le système SOS ? Si induction du système SOS il y a, ce dont nous ne sommes pas tout à fait certains à l'heure actuelle. Deux possibilités : soit le Cx1 possède une cible intracellulaire et crée des dommages à l'ADN (induction des systèmes de réparation dont le système SOS) ; soit la cible est pariétale, et le Cx1 est capable de générer un signal intracellulaire entraînant l'activation du système SOS, la transcription de polymérases non essentielles, conduisant à l'apparition de mutants résistants. Des tests de génotoxicité (test de Ames) sont envisagés, afin d'évaluer le potentiel génotoxique du Cx1.

Qu'en est-il de l'ensemble des résultats particulièrement intéressants obtenus sur *P. aeruginosa* ?

Depuis 2 décennies, *P. aeruginosa* apparaît comme un pathogène opportuniste d'importance croissante, en milieu hospitalier, en particulier chez les patients fragilisés (réanimation,

immunodéprimés), et ceux atteints de mucoviscidose. La principale inquiétude tient au fait que malgré des thérapeutiques antibiotiques agressives, ce pathogène est très difficilement éradiqué du fait de son haut niveau de résistance intrinsèque, et des résistances multiples qu'il est capable d'acquérir [Yokoyama et al., 2007]. *P. aeruginosa* est la bactérie pour laquelle nous disposons du plus grand nombre de données concernant le Cx1. La CMI obtenue est parmi les plus élevées (32 mg/L), mais l'activité du Cx1 est bactéricide à 4xCMI, avec un ralentissement de la croissance dès 0,25xCMI. Le nombre d'interactions de type synergie, obtenu pour *P. aeruginosa* est particulièrement intéressant. Cela impliquerait une déstabilisation membranaire efficace, hypothèse confortée par une interaction forte avec le LPS, à des concentrations bien inférieures à la CMI (extinction optimale de la fluorescence à 1 mg/L et 8 mg/L, contre 32 mg/L pour la CMI). En terme de cible(s) d'action du Cx1, nous avons montré sur *P. aeruginosa* : (i) par AFM, l'existence de brèches au niveau pariétal, et une augmentation de la pression osmotique (rigidité de la bactérie) ; (ii) une modification des propriétés d'adhésion après traitement, et (iii) par microélectrophorèse, une diminution de la perméabilité membranaire. La modification des propriétés d'adhésion a été montrée pour d'autres molécules [Bruinsma et al., 2001] ; l'explication serait une modification de l'hydrophobicité et une diminution de la balance entre les éléments oxygénés et carbonés constituant les éléments de la paroi. Nous n'avons, hélas pas pu mener l'étude par cytométrie en flux, pour des raisons techniques ; ces données de modification de la perméabilité membranaire nous manquent afin de compléter l'étude des effets du Cx1 sur cette souche.

Comment expliquer les résultats obtenus pour *P. aeruginosa* ? Cela repose probablement sur les caractéristiques pariétales de *P. aeruginosa*. Les conditions de croissance, notamment le taux de Mg^{2+} , peuvent affecter le niveau d'acétylation du lipide A de *P. aeruginosa* ; et chez les patients atteints de mucoviscidose par exemple, les souches connues pour être des mutants incapables de synthétiser les chaînes latérales de l'antigène O, portent en majorité un LPS hexa-acétylé (contre penta-acétylé en temps normal) [Pier et al., 2007]. Les groupements phosphate sont de type triphosphate chez la plupart des souches de *P. aeruginosa* analysées, et cette particularité n'a été décrite que pour le LPS de cette espèce bactérienne [Pier et al., 2007]. Et de façon très intéressante, il a été montré que la phosphorylation du core du LPS est essentielle à la viabilité bactérienne. Cette charge globale négative forte à la surface de *P. aeruginosa*, pourrait expliquer une interaction plus forte avec le Cx1, porteur de charges cationiques pré-organisées ; permettant une déstabilisation

transitoire des structures pariétales, autorisant un passage facilité d'autres molécules antibiotiques. L'intervention dans un second temps, d'autres structures pariétales, ou d'autres éléments sécrétés par la bactérie, pourrait entraîner un déplacement du Cx1 préalablement fixé (nous avons montré une séquestration moins importante au cours du temps du LPS, et un effet transitoire sur la croissance bactérienne par les courbes de bactéricidie), et expliquer la nécessité d'une quantité plus importante de Cx1 pour obtenir un effet équivalent à celui obtenu pour des concentrations plus faibles pour *S. aureus* et *E. coli* (saturation de l'ensemble des sites chargés négativement). De plus, des études ont montré que le LPS de *P. aeruginosa*, riche en groupements phosphate, joue un rôle clé dans la résistance intrinsèque de cette bactérie aux antibactériens [Walsh et al., 2000] ; ce qui peut expliquer la difficulté à trouver de nouvelles molécules efficaces contre cette bactérie. Par ailleurs, le traitement de *Pseudomonas stutzeri* par la CHX, entraîne des atteintes similaires à celles observées par AFM dans notre étude (altérations membranaires par MET). Et des taux plus faibles en ions Mg^{2+} , Ca^{2+} et en phosphate ont été obtenus chez les souches résistantes à la CHX [Tattawasart et al., 2000a]. Une modification de la constitution de la membrane externe (LPS, protéines) a par ailleurs été mise en évidence [Hasegawa et al., 1997 ; Tattawasart et al., 2000b], confirmant le rôle primordial de la paroi de *P. aeruginosa* dans ces interactions avec les molécules antibactériennes.

De façon intéressante, dans notre étude de génération de mutants résistants *in vitro*, nous avons montré que le Cx1 est incapable d'induire la génération de mutants résistants chez cette bactérie. Et une analyse plus fine, nous a permis de mettre en évidence une absence de production de pigments chez *P. aeruginosa*, à chaque passage clé où une augmentation de la CMI était obtenue. La pyocyanine, pigment bleu phénazinique, spécifique, soluble dans le chloroforme, joue un rôle dans le transport extracellulaire des électrons. La pyoverdine, quant à elle, est un pigment fluorescent peptidique (+ chromophore quinoline), hydrosoluble, qui joue le rôle de sidérophore et dont la synthèse est favorisée sur milieu carencé en fer. Quel lien peut-il exister entre ces pigments, et l'exposition répétée au Cx1 ? Il a été montré une réponse complexe de *P. aeruginosa* au stress induit par la ciprofloxacine [Cirz et al., 2006]. En plus d'une réponse LexA dépendante, comme souligné plus haut dans la discussion, certains auteurs ont montré une répression de certains gènes impliqués dans le métabolisme, la mobilité, le quorum sensing et la perméabilité membranaire (système de sécrétion de type III) de *P. aeruginosa* [Cirz et al., 2006]. Cette « down-régulation » s'explique par le fait que la ciprofloxacine est active sur les bactéries en division (stratégie de survie). Les pigments pyocyaniques

jouant un rôle important dans certains phénomènes métaboliques, l'arrêt de leur production peut être là aussi une stratégie de survie de *P. aeruginosa* en présence de Cx1 : ralentissement des métabolismes et donc de la multiplication bactérienne, économie d'énergie, et donc survie en présence du stress généré par le Cx1. Cette économie réalisée au niveau du métabolisme peut se réaliser au profit du développement d'un mécanisme de résistance, quel qu'il soit (modification structure de la paroi, des porines, surexpression d'un système d'efflux...), favorable à la bactérie dans un environnement qui ne l'est plus ; expliquant ainsi l'augmentation de la CMI dans les suites de ces processus complexes. Continuer l'évaluation du Cx1 sur diverses souches de *P. aeruginosa*, afin de mieux comprendre l'ensemble de ces interactions et de ces phénomènes, serait un beau challenge, dans l'optique de trouver « la » molécule ayant une activité optimale sur cette espèce bactérienne. C'est une des perspectives de ce travail de thèse.

Enfin, un des autres intérêts de ce travail, est d'avoir souligné l'importance d'une réflexion sur les relations structure-activité, lorsque nous nous engageons dans un thématique de recherche de nouvelles molécules antibactériennes. De nombreux éléments sont aujourd'hui bien appréhendés sur le mécanisme d'action des antibiotiques et des antiseptiques, et une meilleure connaissance des mécanismes de résistance développés par les bactéries, nous permettent d'optimiser rapidement la synthèse de nouvelles molécules. Ainsi, les études d'efficacité et de toxicité menées au cours de ce travail, nous ont permis, en dehors de souligner l'intérêt du Cx1, de poser les premières bases en terme de relations structure-activité. Nous avons été freinés, dans un premier temps, par l'absence de molécules, antiseptiques ou antibiotiques, comparables en terme de structure au Cx1. Ceci est en effet un avantage de notre approche : le Cx1 est une molécule totalement synthétique, apparentée à aucune famille d'antibactériens actuellement commercialisée : mécanisme d'action potentiellement innovant mais aussi peu de risque de sensibilité aux mutations de résistance précédemment décrites. Mais c'est aussi un inconvénient majeur pour l'avancée de nos travaux en terme de RSA ou de mécanismes d'action, du fait de l'absence de véritable comparateur ! Nous nous sommes donc orientés vers des molécules proches en terme de groupements structuraux : synthaline (bis-guanidinium), hexamidine (diamidine aromatique) et chlorhexidine (bis-biguanide), molécules choisies puisque aucun antibiotique actuellement commercialisé ne possède de telles fonctions. Concernant l'activité antibactérienne, les groupements cationiques (guanidine ou amidine), ainsi que

leur pré-organisation sur des cycles aromatiques, liés entre eux par une chaîne alkyl ou sous forme calixarénique jouent un rôle clé : absence d'activité de la synthaline mais aussi du monomère (mCx1), par comparaison aux autres molécules [Grare et al., 2007a]. Les composés linéaires testés apparaissent particulièrement toxiques ; le Cx1 et le mCx1 se caractérisent, par une quasi-absence de toxicité *in vitro*. Toutes ces observations conduisent à la conclusion suivante : réunir plusieurs charges cationiques n'est pas une condition suffisante à l'activité antibactérienne (et à la toxicité), une organisation de ces charges est indispensable pour favoriser les interactions avec la paroi bactérienne, ce qui a déjà été souligné par d'autres auteurs [Daoud et al., 1983].

La longueur de la chaîne alkyl des composés linéaires peut-elle jouer sur l'activité antibactérienne et la toxicité ? Certains auteurs ont déjà souligné l'importance de la longueur de la chaîne alkyl (variable selon les bactéries) [Gilbert & Moore, 2005], et nous avons constaté la similitude de longueur ($n = 6$) entre l'hexamidine et la chlorhexidine. Concernant l'activité des QACs, par exemple, l'activité est maximale pour une chaîne de 12 à 14 carbones (Gram +), ou 14 à 16 C (Gram -) [Gilbert & Moore, 2005]. La même constatation a été faite pour les composés de type polyhexaméthylène biguanides, beaucoup plus efficaces pour une chaîne alkyl > 10 carbones [Gilbert & Moore, 2005]. La capacité des PHMB à créer des domaines phospholipidiques est fonction de la longueur de la chaîne alkyl : plus elle est longue, plus les domaines formés peuvent être importants, et plus efficace est la déstabilisation membranaire [Ikeda, 1991]. Concernant la chlorhexidine, il est très intéressant de constater que la longueur de la chaîne hexaméthylène correspond exactement à la distance entre deux têtes phospholipidiques [Davies et al., 1954]. Cela expliquerait la perte d'activité dès qu'une modification est opérée au niveau de la longueur de la chaîne alkyl. Parmi les nouveaux composés de type cationiques synthétisés ces dernières années et évalués pour leur activité antibactérienne, les mêmes critères apparaissent indispensables :

- (i) l'existence de plusieurs charges cationiques [Mancini et al., 2004 ; Chelossi et al., 2006] ;
- (ii) la non équivalence entre les différents types de groupements cationiques (ammonium << phosphonium < pyridinium/guanidinium +++) [Kanazawa et al., 1993 ; Salmi & Brunel, 2007] ;
- (iii) l'influence de la longueur de la chaîne alkyl [Kanazawa et al., 1994 ; Birnie et al., 2000] ;
- (iv) la nécessité d'une partie hydrophobe, de localisation appropriée [Wu et al., 2008] ;

- (v) des conditions suffisantes différentes selon que l'on considère les bactéries à Gram – ou à Gram + [Devinsky et al., 1990].

Des travaux ont été menés au sein de notre Laboratoire afin de confirmer l'importance de la longueur de la chaîne alkyl. Cette étude a été menée en étroite collaboration avec le CERMN dirigé par le Pr. Sylvain RAULT (Caen). Nous avons confirmé l'influence de la chaîne alkyl chez une famille de 10 dérivés de la synthaline [travaux présentés lors de la RICAI, 2007], ainsi que chez une famille de 10 dérivés de l'hexamidine [travaux présentés lors de la RICAI, 2008], ne différant que par la longueur de la chaîne alkyl ($n = 2$ à 10 C). Nous avons ainsi montré que plus la longueur de la chaîne augmente, plus l'activité et la toxicité sont importantes [Grare & Duval, données non publiées]. Les composés présentant le meilleur compromis efficacité/tolérance sont $n = 6$ et $n = 3$ (sur *P. aeruginosa*) pour les dérivés bis-amidino-alkanes, et $n = 8$ pour les dérivés bis-guanidino-alkanes. Aucune influence des contre-ions (base, $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$, HCl) n'a pu être mise en évidence [Grare & Duval, données non publiées]. Afin de pousser plus avant nos investigations et nos réflexions en terme de relations structure-activité, des composés linéaires porteurs des fonctions acylguanidinium du Cx1, et variant uniquement par la longueur de la chaîne alkyl ont été synthétisés, et font l'objet d'un brevet.

En conclusion, le Cx1 possède un potentiel intéressant en terme de nouvel antibactérien. Sa nature polycationique semble parfaitement dessinée pour permettre un maximum d'interactions à la fois avec les composants hydrophiles et hydrophobes, chargés négativement, de la paroi bactérienne. Le fait que la paroi bactérienne soit une cible universelle, relativement conservée, peut expliquer le spectre large obtenu pour le Cx1. De nombreuses inconnues demeurent encore concernant son mécanisme d'action, et sa ou ses cible(s) d'action. A concentration significative, le Cx1 pourrait non seulement interagir avec la paroi, mais aussi interférer avec divers processus physiologiques, et entraîner des dommages à différents niveaux cellulaires, ce qui rendrait la survenue de résistance plus difficile. Nous avons répondu à certaines questions que nous nous étions posées au début de ce travail. Mais chaque réponse donnait lieu à de nouvelles questions... et les directions que pourront prendre les futurs travaux sont nombreuses ! Ce travail a en effet ouvert grande la porte à de nombreuses voies de recherche afin de mieux appréhender les cibles de cette molécule, et d'en optimiser les propriétés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Agrawal, Y.K., H. Bhatt.** 2004. Calixarenes and their biomimetic applications. *Bioinorg Chem Appl.* 2:237-274.
2. **Alsteens, D., C. Verbelen, E. Dague, D. Raze, A.R. Baulard, Y.F. Dufrêne.** 2008. Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view. *Plugers Arch.* 456:117-125.
3. **Amsler, K.M., T.A. Davies, W. Shang, M.R. Jacobs, K. Bush.** 2008. *In vitro* activity of ceftobiprole against pathogens from two phase 3 clinical trials of complicated skin and skin structure infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:3418-3423.
4. **Andersson, D.I.** 2006. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions ? *Curr Opin Microbiol.* 9:461-465.
5. **Andres, E., J.L. Dimarcq.** 2006. Peptides antimicrobiens cationiques: de nouvelles armes thérapeutiques dans le domaine de l'infectiologie. *Med Therap.* 12:264-270.
6. **Anonyme.** Press release for: The Third Prevalence Survey of Healthcare-associated Infections in Acute Hospitals. Hospital Infection Society. 27/10/06.
http://www.his.org.uk/content_display.cfm?cit_id=461.
7. **Aoki, H., L. Ke, S.M. Poppe, T.J. Poel, E.A. Weaver, R.C. Gadwood, R.C. Thomas, D.L. Shinabarger, M.C. Ganoza.** 2002. Oxazolidinone antibiotics target the P site on *Escherichia coli* ribosomes. 46:1080-1085.
8. **Arduini, A., W.M. McGregor, A. Pochini, A. Secchi, F. Ugozzoli, R. Ungaro.** 1996. New Upper Rim Pyridine-Bridged Calix[4]arenes: Synthesis and Complexation Properties toward Neutral Molecules and Ammonium Ions in Organic Media. *J Org Chem.* 61:6881-6887.
9. **Arnoldi, M., C.M. Kacher, E. Bäuerlein, M. Radmacher, M. Fritz.** 1998. Elastic properties of the cell wall of *Magnetospirillum gryphiswaldense* investigated by atomic force microscopy. *Appl Phys A.* 66:S613-617.
10. **Arnoldi, M., M. Fritz, E. Bäuerlein, M. Radmacher, E. Sackmann, A. Boulbitch.** 2000. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys Rev.* 62:1034-1044.
11. **Asfari, Z., V. Böhmer, J. Harrowfield, J. Vicens.** 2001. Calixarenes 2001, Eds; Kluwers Dordrecht, The Netherlands.

12. **Aubert-Foucher, E., A. W. Coleman, D. J. S. Hulmes.** 1999. French Patent, FR60252J, France.
13. **Aucken, H.M., M. Ganner, S. Murchan, B.D. Cookson, A.P. Johnson.** 2002. A new UK strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 50:171-175.
14. **Bailly, C., D. Perrine, J.-C. Lancelot, C. Saturnino, M. Robba, M.J. Waring.** 1997. Sequence-selective binding to DNA of bis(amidinophenoxy)alkanes related to propamidine and pentamidine. *Biochimie J.* 323:23-31.
15. **Balakrishna, R., S.J. Wood, T.B. Nguyen, K.A. Miller, E.V. Suresh Kumar, A. Datta, S.A. David.** 2006. Structural correlates of antibacterial and membrane-permeabilizing activities of acylpolyamines. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:852-861.
16. **Barcia-Macay, M., S. Lemaire, M.P. Mingeot-Leclercq, P.M. Tulkens, F. Van Bambeke F.** 2006. Evaluation of the extracellular and intracellular activities (human THP-1 macrophages) of telavancin versus vancomycin against methicillin-susceptible, methicillin-resistant, vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 58:1177-1184.
17. **Bassetti, M., L. Nicolini, S. Esposito, E. Righi, C. Viscoli.** 2009. Current status of newer carbapenems. *Curr Med Chem.* 16:564-575.
18. **Bayer A.** 1872a. Ueber die Verbindungen der Aldehyde mit den Phenolen. *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft.* 5:25-26.
19. **Bayer A.** 1872b. Ueber die Verbindungen der Aldehyde mit den Phenolen. *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft.* 5:280-282.
20. **Bayer A.** 1872c. Ueber die Verbindungen der Aldehyde mit den Phenolen und aromatischen Kohlenwasserstoffen. *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft.* 5:1094-1100.
21. **Bell, C.A., M. Cory, T.A. Fairley, J.E. Hall, R.R. Tidwell.** 1991. Structure-activity relationships of pentamidine analogs against *Giardia lamblia* and correlation of anti-giardial activity with DANN-binding affinity. *Antimicrob Agents Chemother.* 35:1099-1107.
22. **Berenbaum, M.** 1987. Minor synergy and antagonism may be clinically important. *J Antimicrob Chemother.* 19:271-280.

23. **Berquand, A., M.P. Mingeot-Leclercq, Y.F. Dufrêne.** 2004. Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy. *Bioch Biophysic Acta*. 1664:198-205.
24. **Binnig, G., C.F. Quate, C. Gerber.** 1986. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*. 56:930-933.
25. **Birnie C.R., Malamud D., Schnaare R.L.** 2000. Antimicrobial evaluation of N-alkylbetaines and N-alkyl-N, N dimethylADMAOs with variation in chain lenght. *Antimicrob Agents Chemother*. 44:2514-2517.
26. **Bogdanovich, T., C. Clark, L. Ednie, G. Lin, K. Smith, S. Shapiro, P.C. Appelbaum.** 2006. Activities of ceftobiprole, a novel broad-spectrum cephalosporin, against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:2050-2057.
27. **Bos, R., H.C. Van der Mei, H.J. Busscher.** 1998. 'Soft-particle' analysis of the electrophoretic mobility of a fibrillated and non-fibrillated oral streptococcal strain: *Streptococcus salivarius*. *Biophys Chem*. 74:251-255.
28. **Boucher, H.W., G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett.** 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE ! an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 48:1-12.
29. **Boyce, S.T., G.D. Warden, I.A. Holder.** 1995. Cytotoxicity testing of topical agents on human keratinocytes and fibroblasts for cultured skin grafts. *J Burn Care Rehabil*. 16:97-103.
30. **Braga, P.C., D. Ricci, M. Dal Sasso.** 2002a. Daptomycin morphostructural damage in *Bacillus cereus* visualized by atomic microscopy. *J Chemother*. 14:336-341.
31. **Braga, P.C., D. Ricci.** 2002b. Differences in the susceptibility of *Streptococcus pyogenes* to rokitamycin and erythromycin A revealed by morphological atomic force microscopy. *J Antimicrob Chemother*. 50:457-460.
32. **Braga, P.C., D. Ricci.** Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. 1998. *Antimicrob Agents Chemother*. 142:18-22.
33. **Braga, P.C., M. Culici, D. Ricci, M. Dal Sasso.** 2003. Morphostructural damage and the inhibition of bacterial adhesiveness of *Staphylococcus aureus* and *Moraxella catarrhalis* induced by moxifloxacin. *J. Chemother*. 15:543-550.

34. **Braga, P.C., M. Dal Sasso, S. Maci.** 1997. Cefodizime : effects of subinhibitory concentrations on adhesiveness and bacterial morphology of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: comparison with cefotaxime and ceftriaxone. *J Antimicrob Chemother.* 39:79-84.
35. **Brodersen, D.E., W.M. Clemons, A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, V. Ramakrishnan.** 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell.* 103:1143-1154.
36. **Brosin, A., V. Wolf, A. Mattheus, H. Heise.** 1997. Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salts in human keratinocytes (HaCaT). A feasible method for in vitro testing of skin irritants. *Acta Derm Venereol;* 77:26-28.
37. **Brown, E.D.** 2006. Microbiology: antibiotic stops 'ping-pong' match. *Nature.* 441:293-294.
38. **Broxton, P., P.M. Woodcock, P. Gilbert.** 1984a. Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC 8739 from treatment with some polyhexamethylene biguanides. *Microbios.* 40:187-193.
39. **Broxton, P., P.M. Woodcock, P. Gilbert.** 1984b. Binding of some polyhexamethylene biguanides to the cell envelope of *Escherichia coli* ATCC 8739. *Microbios.* 41:15-22.
40. **Broxton, P., P.M. Woodcock, F. Heatley, P. Gilbert.** 1984c. Interaction of some polyhexaméthylène biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol.* 57:115-124.
41. **Bryskier A.** 2006. Relation activité-structure des agents antibactériens. *Antibiotiques.* 8:136-146.
42. **Bulet, P., C. Hetru, J.L. Dimarcq, D. Hoffmann.** 1999. Antimicrobial peptides in insects ; structure and function. *Dev Comp Immunol.* 47:451-463.
43. **Buxbaum, A., C. Kratzer, W. Graninger, A. Georgopoulos.** 2006. Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide Akacide Plus. *J Antimicrob Chemother.* 58:193-197.
44. **Calop, J., S. Limat, C. Fernandez, F. Gimenez.** 2008. Chapitre 45. Principes d'utilisation des antibiotiques. Dans « Pharmacie clinique et Thérapeutique, 3^{ème} édition ». Editions Masson, Paris.
45. **Campanac, C., L. Pineau, A. Payard, G. Baziard-Mouysset, C. Roques.** 2002. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:1469-1474.

46. **Canton, R., T.M. Coque.** 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current opinion in Microbiology*. 9:466-475.
47. **Cappellety, D.M., M.J. Rybak.** 1996. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 40:677-683.
48. **CA-SFM.** Recommandations 2008. www.sfm-asso.fr
49. **Casnati, A., E. Di Modugno, M. Fabbi, N. Pelizzi, A. Pochini, F. Sansone, G. Tarzia, R. Ungaro.** 1996. Synthesis, Antimicrobial Activity and Binding Properties of calix[4]arene based Vancomycin Mimics. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 6:2699-2704.
50. **Caumes, E., M. LeMaitre, J.M. Garnier, F. Bricaire, B. Crickx.** 2006. Clinical tolerance of cutaneous antiseptics in 3403 patients in France. *Ann Dermatol Venereol*. 133:755-760.
51. **CDC.** 2004. *Acinetobacter baumannii* infections among patients among military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 53:1063-1066.
52. **Cha, R., R.G. Grucz, M.J. Ryback.** 2003. Daptomycin dose-effect relationship against resistant gram-positive organisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:1598-1603.
53. **Chait, R., A. Craney, R. Kishony.** 2007. Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature*. 446:668-671.
54. **Chelossi, E., I. Mancini, K. Sepcic, T. Turk, M. Faimali.** 2006. Comparative antibacterial activity of polymeric 3-alkylpyridinium salts isolated from the Mediterranean sponge *Reniera sarai* and their synthetic analogues. *Biomol Eng*. 23:317-323.
55. **Chen, Z.Y., X.P. Xuo, J.Y. Huang, Y.M. Hong, Q. Zhang.** 2006. AFM study of the effect of metronidazole on surface structures of sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe*. 12:106-109.
56. **Chevalier, J., A. Crémieux.** 1992. Comparative study on the antimicrobial effects of Hexomedine and Betadine on the human skin flora. *J Appl Bacteriol*. 73:342-348.
57. **Chin, J.N., M.J. Ryback, C.M. Cheung, P.B. Savage.** 2007. Antimicrobial activities of ceragenins against clinical isolates of resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 51:1268-1273.

58. **Chin, J.N., R.N. Jones, H.S. Sader, P.B. Savage, M.J. Ryback.** 2008. Potential activity of the novel ceragenin, CSA-13, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, including multidrug-resistant *P. aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 61:365-370.
59. **Cirz, R.T., B.M. O'Neill, J.A. Hammond, S.R. Head, F.E. Romesberg.** 2006. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. J Bacteriol. 188:7101-7110.
60. **Cirz, R.T., J.K. Chin, D.R. Andes, V. de Crecy Lagard, W.A. Craig, F.E. Romesberg.** 2005. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. Plos Biol. 3:1-10.
61. **Cirz, R.T., M.B. Jones, N.A. Gingles, T.D. Minogue, B. Jarrahi, S.N. Peterson, F.E. Romesberg.** 2007. Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. J Bacteriol. 189:531-539.
62. **Clinical Laboratory Standards Institut.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A6. NCCLS Wayne, Pa, USA, 2003.
63. **Coignard, B., J.M. Thiolet, L. Lacavé** pour le groupe de travail ENP 2006. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, juin 2006. Résultats préliminaires 12 janvier 2007. <http://www.invs.sante.fr/recherche/index2.asp?txtQuery=infections+nosocomiales&Submit.x=0&Submit.y=0>
64. **Colodner, R., W. Rock, B. Chazan.** 2004. Risk factors for the development of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in non-hospitalized patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 23:163-167.
65. **Colston, M.J., H.C. Hailes, E. Stavropoulos, A.C. Hervé, G. Hervé, K.J. Goodworth, A.M. Hill, P. Jenner, P.D. Hart, R.E. Tascon.** 2004. Antimycobacterial Calixarenes Enhance Innate Defense Mechanisms in Murine Macrophages and Induce Control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. Infect Immun. 72:6318-6323.
66. **Cooper, M.L., S.T. Boyce, J.F. Hansbrough, T.J. Foreman, D.H. Franck.** 1990. Cytotoxicity to cultured human keratinocytes of topical antimicrobial agents. J Surg Res. 48: 190-195.
67. **Cornforth, J.W., E.D. Morgan, K.T. Potts, R.J.W. Rees.** 1973. Preparation of antituberculous poly(oxyethylene ethers) of homogeneous structure. Tetrahedron. 29:1659-1667.

68. **Cornforth, J.W., P.D. Hart, G.A. Nicholls, R.J.W. Rees, J.A. Stock.** 1955. Antituberculous effects of certain surface-active polyoxyethylene ethers. *Br J Pharmacol.* 10:73-86.
69. **Courvalin, P.** 2006. Antibiotiques ?????
70. **Cui, L., A. Iwamoto, J-Q. Lian, H-M. Neoh, T. Maruyama, Y. Horikawa, K. Hiramatsu.** 2006. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:428-438.
71. **Dague, E., J. Duval, F. Jorand, F. Thomas, F. Gaboriaud.** 2006. Probing surface structures of *Shewanella spp.* by microelectrophoresis. *Biophys J.* 90:2612-2621.
72. **Dai, G.F., N. Cheng, L. Dong, M. Muramatsu, S.D. Xiao, M.W. Wang.** 2005. Bactericidal and morphological effects of NE-2001, a novel synthetic agent directed against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3468-3473.
73. **Damour, O., S. Zhi Hua, F. Lasne, M. Villain, P. Rousselle, C. Collombel.** 1992. Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns.* 18:479-485.
74. **Daoud, N.N.D., N.A. Dickinson, P. Gilbert.** 1983. Antibacterial activity and physicochemical properties of some alkyl-demethylbenzyl ammonium chlorides. *Microbios.* 37:75-85.
75. **DaSilva, C.F., M.M. Batista, G. Dda, E.M. de Souza, P.B. Da Silva, G.M. de Oliveira, A.S. Meuser, A.R. Shareef, D.W. Boykin, M.N. Soeiro.** 2008. *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:3307-3314.
76. **DaSilva, E., P. Shahgaldian, A. W. Coleman.** 2004. Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[n]-arenes. *Int J Pharm.* 273:57–62.
77. **Daube, D., J-L. Laborie, C. Schvoerer, A. Lepoutre, F. Quittançon, J. Chaperon, G. Dien, J. Etienne, B. Coignard.** 2003. Infections cutanées à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et producteur de la leucocidine de Panton Valentine, Côtes-d'Armor, octobre 1999 à août 2002. *BEH.* 47/2003:229-230.

78. **Davies, G.E., J. Francis, A.R. Martin, F.L. Rose, G. Swain.** 1954. 1:6-di-4'-chlorophenyldiguanidinothexane (Hibitane). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol.* 9:192-196.
79. **Debbasch, C., M. de Saint Jean, P.J. Pisella, P. Rat, J.M. Warnet, C. Baudoin.** 1999. Quaternary ammonium cytotoxicity in a human conjunctival cell line. *J Fr Ophtalmol.* 22:950-958.
80. **Deininger, S., A. Stadelmaier, S. Von Aulock, S. Morath, R.R. Schmidt, T. Hartung.** 2003. Definition of structural prerequisites for lipoteichoic acid-inducible cytokine induction by synthetic derivatives. *J Immunol.* 170:4134-4138.
81. **Denis, F., M.-C. Ploy, C. Martin, E. Bingen, R. Quentin.** 2008. Chapitre 38. Instauration et surveillance d'un traitement antibiotique. Dans « Bactériologie Médicale, Techniques Usuelles ». Editions Masson, Paris.
82. **Desnottes J.F.** 1999. Nouvelles molécules et nouvelles cibles en antibiothérapie. *Antibiotiques.* 1:201-209.
83. **Deutschle, T., U. Porkert, R. Reiter, T. Keck, H. Riechelman.** 2006. *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicol In Vitro.* 20:1472-1477.
84. **Devinsky, F., A. Kopecka-Leitmanova, F. Sersen, P. Balgavy.** 1990. Cut-off effect in antimicrobial activity and in membrane perturbation efficiency of the homologous series of N,N-dimethylalkylamine oxides. *J Pharm Pharmacol.* 42:790-794.
85. **Dinares, I., C. Garcia de Miguel, N. Mesquida, E. Alcalde.** 2009. Bis(imidazolium)calix[4]arene receptors for anion binding. *J Org Chem.* 74:482-485.
86. **Ding, B., Q. Guan, J.P. Walsh, J.S. Boswell, T.W. Winter, E.S. Winter, S.S. Boyd, C. Li, P.B. Savage.** 2002. Correlation of the antibacterial activities of cationic peptide antibiotics and cationic steroid antibiotics. *J Med Chem.* 45:663-669.
87. **Dmitriev, B., F. Toukach, S. Ehlers.** 2005. Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends Microbiol.* 13:569-574.
88. **Doan, T.L., H.B. Fung, D. Mehta, P.F. Riska.** 2006. Tigecycline: a glycylcycline antimicrobial agent. *Clin Therap.* 28:1079-1106.

89. **Donskey, C.J., J.A. Hanrahan, R.A. Hutton, L.B. Rice.** 2000. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med.* 343:1925-1932.
90. **Drago, L., E. De Vecchi, L. Nicola, L. Tocalli, M.R. Gismondo.** 2005. *In vitro* selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with β -lactams and amikacin. *J Antimicrob Chemother.* 56:353-359.
91. **Drlica, K., X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:377-392.
92. **Droogmans, G., J. Prenen, J. Eggermont, T. Voets, B. Nilius.** 1998. Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes. *Am. J. Physiol.* 275:C646–652.
93. **Dufrène, Y.F.** 2002. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol.* 184:5205-5213.
94. **Dugar, D.M.** 1948. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann N Y Acad Sci.* 51:177-181.
95. **EARSS Annual Report.** 2007. http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007_FINAL_tcm61-55933.pdf
96. **Ehrlich, J., Q.R. Bartz, R.M. Smith, D.A. Joslyn, P.R. Burkholder.** 1947. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science.* 106:417.
97. **Eliopoulos, G.M., S. Willey, E. Reiszner, P.G. Spitzer, G. Caputo, R.C. Moellering.** 1986. *In vitro* and *in vivo* activity of LY 146032, a new cyclic lipopeptide antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother.* 304:532-535.
98. **Ellis, M.W., D.R. Hospenthal, D.P. Dooley, P.J. Gray, C.K. Murray.** 2004. Natural history of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. *Clin Infect Dis.* 39:971-979.
99. **El Zoeiby, A., F. Sanschagrin, R.C. Levesque.** 2003. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. 47:1-12.

100. **Fabreguette, A., S. Zhi Hua, F. Lasne, P. Damour.** 1994. Evaluation of the cytotoxicity of antiseptics used in current practice on cultures of fibroblasts and keratinocytes. *Pathol Biol.* 42:888-892.
101. **Falagas, M.E., A.P. Grammatikos, A. Michalopoulos.** 2008. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 6:593-600.
102. **Ferner, H., W. Runge.** 1955. Synthalin A as selective mitotic poison acting on alpha-cells in the islets of Langerhans. *Science.* 122:420.
103. **Ferran, A., V. Dupouy, P.-L. Toutain, A. Bousquet-Mélou.** 2007. Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:4163-4166.
104. **Firsov, A.A., M.V. Smirnova, I.Y. Lubenko, S.N. Vostrov, Y.A. Portnoy, S.H. Zinner.** 2006. Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to daptomycin and vancomycin in an *in vitro* dynamic model. *J Antimicrob Chemother.* 58:1185-1192.
105. **Firsov, A.A., S.N. Vostrov, I.Y. Lubenko, K. Drlica, Y.A. Portnoy, S.H. Zinner.** 2003. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. 47:1604-1613.
106. **Fleurette, J., J. Freney, M.-E. Reverdy.** 1995. Antiseptie et désinfection. ESKA Editions, Paris, France.
107. **Francis, J.S., M.C. Doherty, U. Lopatin, C.P. Johnston, G. Sinha, T. Ross, M. Cai, N.N. Hansel, T. Perl, J.R. Ticehurst, K. Carroll, D.L. Thomas, E. Nuermberger, J.G. Bartlett.** 2005. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Infect Dis.* 40:100-107.
108. **Francius, G., O. Domenech, M.P. Mingeot-Leclercq, Y.F. Dufrêne.** 2008. Direct observation of *Staphylococcus aureus* cell wall digestion by lysotaphin. *J Bact.* 190:7904-7909.
109. **Hansen, W., J. Freney.** 2002. Des Bactéries et des Hommes. Ed. Privat, Paris, France.
110. **Friedrich, C.L., D. Moyles, T.J. Beveridge, R.E.Hancock.** 2000. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:2086-2092.

111. **Firdich, E., C. Whithfield.** 2005. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae*. J Endotoxin Res. 11:133-144.
112. **Gaboriaud, F., E. Dague, S. Bailet, F. Jorand, J. Duval, F. Thomas.** 2006. Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as a response to pH change. Colloid Surf B. 52:108-116.
113. **Gaboriaud, F., S. Bailet, E. Dague, F. Jorand.** 2005. Surface structure and nanomechanical properties of *Shewanella putrefaciens* bacteria at two pH values (4 and 10) determined by atomic force microscopy. J Bacteriol. 187:3864-3868.
114. **Ganz, T., R.I. Lehrer.** 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. Mol Med Today. 5:292-297.
115. **Garza-Ramos, G., L. Xiong, P. Zhong, A. Mankin.** 2001. Binding site of macrolides antibiotics on the ribosome : new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA. J. Bacteriol. 183:6898-6907.
116. **Gilbert, P., Moore L.E.** 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. J Appl Microbiol. 99:703-715.
117. **Gillet, Y., B. Issartel, P. Vanhems, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, Y. Piémont, D. Floret, J. Etienne.** 2000. Pneumonie staphylococcique nécrosante associée à la production de la leucocidine de Pantón et Valentine. BEH. 45/2000:197-198.
118. **Glew, R.H., R.A. Pavuk.** 1984. Early synergistic interactions between amikacin and six beta-lactam antibiotics against multiply resistant members of the family *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. 26:378-381.
119. **Glover, R.E., R.R. Smith, M.V. Jones, S.K. Jackson, C.C. Rowlands.** 1999. An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes. FEMS Microbiology Letters. 177:57-62.
120. **Goldstein, B.P., D.C. Draghi, D.J. Sheehan, P. Hogan, D.F. Sahm.** 2007. Bactericidal activity and resistance development profiling of dalbavancin. Antimicrob Agents Chemother. 51:1150.
121. **Goossens, A., L. Claes, J. Drieghe, E. Put.** 1997. Antimicrobials: preservatives, antiseptics and disinfectants. Contact dermatitis. 39:133-134.

122. **Gori, T., A. Visconti, U. Aheri, M. Sangovanni, F. Scrollini, M. Basagni, P. Beggi.** 1979. Quantitative evaluation of antibacterial activity *in vitro* of associated chemoantibiotics. In *Combin Antimicrob Therap*, pp 69-86, Martinus Nijhoff, The Hague.
123. **Gough, M., R.E.W. Hancock, N.M. Kelly.** 1996. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun.* 64:4922-4927.
124. **Grare, M., M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval.** 2006. Towards new antibacterial drugs. Interest of para-guanidinoethylcalix[4]arene. *Pathol Biol.* 54:470-476.
125. **Grare, M., M. Mourer, S. Fontanay, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval.** 2007a. In vitro activity of para-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 60:575-581.
126. **Grare, M., E. Dague, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, J.F.L. Duval, R.E. Duval, F. Gaboriaud.** 2007b. Microelectrophoresis and atomic force microscopy: new tools to explore mechanism of action of antibacterial compounds. 55:465-471.
127. **Grare, M., S. Fontanay, C. Cornil, C. Finance, R.E. Duval.** 2008. Tetrazolium salts for MIC determination : why ? which salt to select ? how ? *J Microbiol Methods.* 75:156-159.
128. **Grare, M., H. Massimba Dibama, S. Lafosse, A. Ribon, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval.** 2009a. Cationic compounds vs. multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound versus two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clin Microbiol Infect.* Accepted.
129. **Greenhill, J.V., P. Lue.** 1993. Amidines and guanidines in medicinal chemistry. *Prog Med Chem.* 30:203-326.
130. **Gualbert, J., P. Shahgaldian, A.W. Coleman.** 2003. Interactions of amphiphilic calix[4]arene-based solid lipid nanoparticles with bovine serum albumin. *Int J Pharm.* 257:69-73.
131. **Guérillot, F., G. Carret, J.P. Flandrois.** 1993. Mathematical model for comparison of time-killing curves. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:1685-1689.
132. **Guérin-Méchin, L., J.Y. Leveau, F. Dubois-Brissonnet.** 2004. Resistance of spheroplasts and whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal activity of various biocides: evidence of the membrane implication. 159:51-57.

133. **Gutsche, C.D.** 1985. Host Guest Complex Chemistry Macrocycles: Synthesis, Structures, Applications, ed. E. Weber, Springer, Berlin.
134. **Gutsche, C.D., I. Alam.** 1988. Calixarenes. 23. The Complexation and Catalytic Properties of Water Soluble Calixarenes. *Tetrahedron*. 44:4689-4694.
135. **Gutsche, C.D., R. Muthukrishnan.** 1978. Calixarenes. 1. Analysis of the product mixtures produced by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with para-substituted phenols. *J Org Chem*. 43:4905-4906.
136. **Haag, P., P. Lexa, I. Werkhäuser.** 1986. Artifacts in dilution pharmacokinetic models caused by adherent bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 29:765-768.
137. **Häbich, D., F. von Nussbaum.** 2006. Platensimycin, a new antibiotic and « superbug challenger » from Nature. *Chem Med Chem*. 1:951-954.
138. **Hamilton-Miller, J.M.T.** 1985. Rationalisation of terminology and methodology in the study of antibiotic interaction. *J Antimicrob Chemother*. 15:655-658.
139. **Hancock, R.E.W.** 1999. Host defense peptides. *Drugs*. 57:469-473.
140. **Hancock, R.E.W.** 1984. Alterations in outer membrane permeability. *Ann Rev Microbiol*. 38:237-264.
141. **Hancock, R.E.W., V.J. Raffle, T.I. Nicas.** 1981. Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killings in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 19:777-785.
142. **Heddle, J., A. Maxwell.** 2002. Quinolone binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrob Agents Chemother*. 46:1805-1815.
143. **Helander, I.M., H. Alakomi, K. Latva-Kala, P. Koski.** 1997. Polyethylenimine is an effective permeabilizer of gram-negative bacteria. *Microbiology*. 143:3193-3199.
144. **Hendlin, D., E.O. Stapley, M. Jackson, H. Wallick, A.K. Miller, F.J. Wolf, T.W. Miller, L. Chaiet, F.M. Kahan, E.L. Foltz, H.B. Woodruff, J.M. Mata, S. Hernandez, S. Mochales.** 1969. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. 166:122-123.
145. **Hewlett, P.S.** 1969. Measurements of the potencies of drug mixtures. *Biometr*. 25:477-487.

146. **Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, F.C. Tenover.** 1997b. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 40:135-136.
147. **Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, I. Kobayashi.** 1997a. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet. 350:1670-1673.
148. **Hoffmann, J.A., F.C. Kafatos, C.A. Janeway, R.A. Ezekowitz.** 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. 284:1313-1318.
149. **Holst, O.** 2007. The structures of core regions from enterobacterial lipopolysaccharides-an update. FEMS Microbiol Lett. 271: 3-11.
150. **Hopper, D.C.** 1999. Mode of action of fluoroquinolones. Drugs. 58(suppl2):6-10.
151. **Horrevorts, A.M., C.M. de Ridder, M.C. Poot, M.J. de Jonge, J.E. Degener, G. Dzoljic-Danilovic, M.F. Michel, K.F. Kerrebijn.** 1987. Checkerboards titrations : the influence of serial dilutions of antibiotics on the fractional inhibitory concentration index and fractional bactericidal concentration index. J Antimicrob Chemother. 19:119-125.
152. **Hwang, K.M., Y.M. Qi, S.Y. Liu, W. Choy, J. Chen.** 1994a. WO Patent 9403164.
153. **Hwang, K.M., Y.M. Qi, S.Y. Liu, T.C. Lee, W. Choy, J. Chen.** 1994b. WO Patent 9403165.
154. **Hwang, K.M., Y. M. Qi, S. Y. Liu, T. C. Lee, W. Choy, J. Chen.** 1991. US Patent, 5196452.
155. **Ikeda, T.** 1991. Antibacterial activity of polycationic biocides. High perform Biomat. 7:743-764.
156. **Jawetz, E., J.B. Gunnison.** 1952. Studies on antibiotic synergism and antagonism. A scheme of combined antibiotic action. Antibio Chemother. 2:243-248.
157. **Jehl, F., M. Chomarat, M. Weber, A. Gérard.** 2004. De l'antibiogramme à la prescription. Editions bioMérieux, Marcy l'Etoile, France.
158. **Jones, T.F., M.E. Kellum, S.S. Porter, M. Bell, W. Schaffner.** 2002. An outbreak of community-acquired forr-borne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 8:82-84.
159. **Kalia, V., R. Miglani, K.P. Purnapatre, T. Mathur, S. Singhal, S. Khan, S.R. Voleti, D.J. Upadhyay, K. Singh Saini, A. Rattan, V. S. Raj.** 2008. Mode of action of ranbezolid against

Staphylococci and structural modeling studies for its interaction with ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:1427-1433.

160. **Kanazawa, A., T. Ikeda, and T. Endo.** 1993. Novel polycationic biocides: synthesis and antibacterial activity of polymeric phosphonium salts. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 31:335-343.

161. **Kanazawa, A., T. Ikeda, T. Endo.** 1994. Synthesis and antimicrobial activity of dimethyl- and trimethyl-substituted phosphonium salts with alkyl chains of various lengths. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:945-952.

162. **Karlberg, J.P.E.** 2008. Trends in disease focus of drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 7:639-640.

163. **Karlowsky, J.A., M.E. Jones, D.C. Draghi, C. Thornsberry, D.F. Sahm, G.A. Vulturo.** 2004. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Am Clin Microbiol Antimicrob.* 3:7-14

164. **Kato, M., T. Irisawa, M. Ohtani, M. Muramatsu.** 1993. A trypsin inhibitor trans-4-guanidinomethylcyclohexanecarboxylic acid-4-tert-butylphenyl ester suppresses the onset of DNA synthesis in *Escherichia coli* cells synchronized by phosphate starvation. *Biol Pharm Bull.* 16:120-124.

165. **Khalil, H., T. Chen, R. Riffon, R. Wang, Z. Wang.** 2008. Synergy between polyethylenimine and different families of antibiotics against a resistant clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:1635-1641.

166. **Kiers, P.J.M., R. Bos, H.C. Van der Mei, H.J. Busscher.** 2001. The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grow in a liquid medium and on solid agar. *Microbiology.* 147:757-762.

167. **Kimbrell, M.R., H. Warshakoon, J.R. Cromer, S. Malladi, J.D. Hood, R. Balakrishna, T.A. Scholdberg, S.A. David.** 2008. Comparison of the immunostimulatory and proinflammatory activities of candidate Gram-positive endotoxins, lipoteichoic acid, peptidoglycan, and lipopeptides, in murine and human cells. *Immunol Lett.* 118:132-141.

168. **King, T.C., D. Schlessinger, D.J. Krogstad.** 1981. The assessment of antimicrobial combinations. *Rev Infect Dis.* 3:627-633.

169. **Kohlhoff, S.A., R. Sharma.** 2007. Iclaprim. *Expert Opin Investig Drugs.* 16:1441-1448.

170. **Kohn, F., C.D. Cross.** 1948. Treatment of local infection with diamidines. *Lancet*, 1948. 23:647-651.
171. **Kolusheva, S., R. Zadmand, T. Shrader, R. Jelinek.** 2006. Color fingerprinting of proteins by calixarenes embedded in lipid/polydiacetylene vesicles. *J Am Chem Soc.* 128:13592-13598.
172. **Kopecka-Litmanova, A., F.Devinsky, D. Mlynarcik, I. Lacko.** 1989. Interactions of ADMAOs and quaternary ammonium salts with membrane and membrane-associated processes in *E. coli* cells: mode of action. *Drug metabolism and drug interactions.* 7:29-51.
173. **Kouvela, E.C., D.L. Kalpaxis, D.N. Wilson, G.P. Dinos.** 2009. Distinct mode of interaction of a novel ketolide antibiotic that displays enhanced antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:1411-1419.
174. **Kratzer, C., S. Tobudic, W. Graninger, A. Buxbaum, A. Georgopoulos.** 2006. *In vitro* antimicrobial activity of the novel polymeric guanidine Akacid plus. *J Hosp Infect.* 63:316-322.
175. **Kratzer, C., S. Tobudic, K. Macfelda, W. Graninger, A. Georgopoulos.** 2007. *In vivo* activity of a novel polymeric guanidine in experimental skin infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:3437-3439.
176. **Kropinski, A.M., J. Kuzio, B.L. Augus, R.E.W. Hancock.** 1982. Chemical and chromatographic analysis of lipopolysaccharide from an antibiotic susceptible mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 21:310-319.
177. **Kwa, A.L., V.H. Tam, M.E. Falagas.** 2008. Polymyxins: a review of the current status including recent developments. *Ann Acad Med Singapore.* 37:870-883.
178. **Lalor, R., H. Baillie-Johnson, C. Redshaw, S.E. Matthews, A. Mueller.** 2008. Cellular uptake of a fluorescent calix[4]arene derivative. *J Am Chem Soc.* 130:2892-2893.
179. **Lamartine, R., J.-B. Regnouf-de-Vains, P. Choquar, A. Marcillac.** 1997. World Patent, WO 97/49677.
180. **Landman, D., C. Georgescu, D.A. Martin, J. Quale.** 2008. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev.* 21:449-465.
181. **Landman, D., S. Bratu, M. Alam, J. Quale.** 2005. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother.* 55:954-957.

182. **LaPlante, K.L., M.J. Ryback.** 2004. Impact of high inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin, in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:4665-4672.
183. **Laue, H., L. Weiss, A. Bernardi, S. Hawser, S. Lociuro, K. Islam.** 2007. *In vitro* activity of the novel diaminopyrimidine, iclaprim, in combination with folate inhibitors and other antimicrobials with different mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother.* 60:1391-1394.
184. **Leach, K.L., S.M. Swaney, J.R. Colca, W.G. McDonald, J.R. Blinn, L.M. Thomasco, R.C. Gadwood, D. Shinabarger, L. Xiong, A.S. Mankin.** 2007. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Molecular Cell.* 26:393-402.
185. **Li, A., P.Y. Lee, B. Ho, J.L. Ding, C.T. Lim.** 2007. Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. *Biochem Biophys Acta.* 1768:411-418.
186. **Li, C., M.R. Lewis, A.B. Gilbert, M.D. Noel, D.H. Scoville, G.W. Allman, P.B. Savage.** 1999. Antimicrobial activities of amine- and guanidine- functionalized cholic acid derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:1347-1349.
187. **Li, X., B.E. Logan.** 2004. Analysis of bacterial adhesion using a gradient force analysis method and colloid probe atomic force microscopy. *Langmuir.* 20:8817-8822.
188. **Lin, Q., A.D. Hamilton.** 2002. Design and synthesis of multiple-loop receptors based on calix[4]arene scaffold for protein surface recognition. *C R Chimie.* 441-450.
189. **Lina, G., Y. Piemont, F. Godail-Gamot.** 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 29:1128-1132.
190. **Livermore, D.M.** 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clin Infect Dis.* 36:11-23.
191. **Livermore, D.M.** 2005. Tigecycline: what is it, and where should it be used ? *J Antimicrob Chemother.* 56:611-614.

192. **Liziola, A., G. Privitera, E. Alliata, E.M. Antonietta Banfi, L. Boselli, M.L. Panceri, M.C. Perna, A.D. Poretta, M.G. Santini, V. Carreri.** 2003. Prevalence of nosocomial infections in Italy: results from the Lombardy survey in 2000. *J Hosp Infect.* 54:141-148.
193. **Loewe, S.** 1953. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneim Forsch.* 3:285-290.
194. **Louie, A., M.R. Deziel, W. Liu, G.L. Drusano.** 2007. Impact of resistance selection and mutant growth fitness on the relative efficacies of streptomycin and levofloxacin for Plague therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:2661-2667.
195. **Love, B.D., S.S. Wright, E.M. Purcell, T.W. Mou, M. Finland.** 1954. Antibacterial action of tetracycline: comparisons with oxytetracycline and chlortetracycline. *Proc Soc Exp Biol Med.* 85:25-29.
196. **Lumetta, G.J., R.D. Rogers, A.S. Gopalan.** 2000. Calixarenes for separations, Eds; ACS Symposium Series 757.
197. **Lyytikäinen, O., M. Kanerva, N. Agthe, T. Mottonen, and the Finish Prevalence Survey Study Group.** 2005. National prevalence survey on nosocomial infections in Finnish acute care hospitals. 10th EPIET Scientific Seminar. Mahon, Menorca, Spain, 13-15 October 2005.
198. **McDonnell, G., A.D. Russell.** 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 12:147-179.
199. **MacGowan, A.P., M. Wooton, A.J. Hedges, K.E. Bowker, H.A. Holt, D.S. Reeves.** 1996. A new time-kill method of assessing the relative efficacy of antimicrobial agents alone and in combination developed using a representative beta-lactam, aminoglycoside and fluoroquinolone. *J Antimicrob Chemother.* 38:193-203.
200. **Mackay, M.L., K. Milne, I.M. Gould.** 2000. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *Int J Antimicrob Agents.* 15:125-129.
201. **Madurga, S., J. Sanchez-Cespedes, I. Belda, J. Vila, E. Giralt.** 2008. Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone-resistance-determining region of DNA gyrase: towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance. *Chembiochem.* 9:2081-2086.
202. **Maeda, S., T. Kita, K. Meguro.** 2009. Synthesis of novel 4,6-di(substitued)amino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine derivatives as topical antiseptic agents. *J Med Chem.* 52:597-600.

203. **Maillard, J.Y.** 2002. Bacterial targets sites for biocide action. *J Appl Microbiol Symp Suppl.* 92:16S-27S.
204. **Maltezou, H.C., H. Giamarellou.** 2006. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents.* 27:87-96.
205. **Malvorh, P., K. Specic, T. Turk, P. Macek.** 1999. Characterization of hemolytic activity of 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 124:221-226.
206. **Mammeri, H., M. Van de Loo, L. Poirel, L. Martinez-Martinez, P. Nordmann.** 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:71-76.
207. **Mancini, I., A. Sicurelli, G. Guella, T. Turk, P. Macek, K. Sepcis.** 2004. Synthesis and bioactivity of linear oligomers related to polymerix alkylpyridinium metabolites from the Mediterranean sponge *Reniera sarai*. *Org Biomol Chem.* 2:1368-1375.
208. **Margolis, P.S., C.J. Hackbarth, D.C. Young, W. Wang, D. Chen, Z. Yuan, R. White, J. Trias.** 2000. Peptide deformylase in *Staphylococcus aureus*: resistance to inhibition is mediated by mutations in the formyltransferase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:1825-1831.
209. **Mattsson, E., J. Rollof, J. Verhoef, H. Van Dijk, A. Fleer.** 1994. Serum-induced potentiation of tumor necrosis factor α production by human monocytes in response to staphylococcal peptidoglycan: involvement of different serum factors. *Infect Immun.* 62:3837-3843.
210. **May, T.** 2008. Les nouveaux antibiotiques. *Rev Med Int.* 29S:S11-S12.
211. **Mecca, T., G.M.L. Consoli, C. Geraci, F. Cunsolo.** 2004. Designed calix[8]arene-based ligands for selective tryptase surface recognition. *Bioorg. Med. Chem.* 12:5057-5062.
212. **Meincken, M., D.L. Holroyd, M. Rautenbach.** 2005. Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:4085-4092.
213. **Mercier, R.C., L. Hrebickova.** 2005. Oritavancine: a new avenue for resistant Gram-positive bacteria. *Expert Rev Anti-Infect Ther.* 3:325-332.

214. **Michel, G., M. Truquet, J. Mondain, P. Poitou.** 1986. Comparison of in vivo antibacterial activity of hydroalcoholic solutions of hexamidine and of chlorhexidine. *J Int Med Res.* 14:205-209.
215. **Miller, K.** 2004. ?????
216. **Miller, K., A.J. O'Neill, M.H. Wilcox, E. Ingham, I. Chopra.** 2008b. Delayed development of linezolid resistance in *Staphylococcus aureus* following exposure to low levels of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:1940-1944.
217. **Miller, K., C.J. Dunsmore, C.W.G. Fishwick, I. Chopra.** 2008a. Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl-transferase center. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:1737-1742.
218. **Miller, M.H., S.A. Feinstein, R.T. Chow.** 1987. Early effects of beta-lactams on aminoglycoside uptake, bactericidal rates, and turbidimetrically measured growth in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 31:108-110.
219. **Miranda-Novales, G., B.E. Leanos-Miranda, M. Vilchis-Perez, F. Solorzano-Santos.** 2006. In vitro activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycin, and amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 5: 25-30.
220. **Montgomery, A.B., R.J. Debs, J.M. Luce, K.J. Corkery, J. Turner, E.N. Brunette, E.T. Lin, P.C. Hopewell.** 1987. Aerosolised pentamidine as sole therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Lancet.* 29:480-483.
221. **Morisaki, H., S. Nagai, H. Ohshima, E. Ikemoto, K. Kogure.** 1999. The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology.* 45:2797-2802.
222. **Morrissey, I., K. Hoshino, K. Sato, A. Yoshida, I. Hayakawa, M.G. Bures, L.L. Shen.** 1996. Mechanism of differential activities of ofloxacin enantiomers. *Antimicrob Agents Chemother.* 40:1775-1784.
223. **Mourer, M., R.E. Duval, C. Finance, J.B. Regnoul-de-Vains.** 2006. Functional organisation and gain of activity: The case of the antibacterial *para*-guanidinoethylcalix[4]arene. *Bioorg Med Chem Lett.* 16: 2960-2963.
224. **Mullins, R.J.** 2006. Systemic allergy to topical hexamidine. *Med J Aust.* 185:177.

225. **Munde, M., M.A. Ismail, R. Arafa, P. Peixoto, C.J. Collar, Y. Liu, L. Hu, M.H. David-Cordonnier, A. Lansiaux, C. Bailly, D.W. Boykin, W.D. Wilson.** 2007. Design of DNA minor groove binding diamidines that recognize GC base pair sequences: a dimeric-hinge interaction motif. *J Am Chem Soc.* 129:13732-13743.
226. **Mutohac, L.** 2008. Functionalized calix[n]arenes as membrane transporters for biological compounds. A minireview. *Curr Drug Discov Technol.* 5:98-104.
227. **Nagamune, H., T. Maeda, K. Ohkura, K. Yamamoto, M. Nakajima, H. Kourai.** 2000. Evaluation of the cytotoxic effects of bis-quaternary ammonium antimicrobial reagents on human cells. *Toxicol In Vitro.* 14:139-147.
228. **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report.** Data summary from January 1992 through June 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470-485.
229. **Nikaido, H., M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 49:1-32.
230. **Nilsson, A.I., O.G. Berg, O. Aspevall, G. Kahlmeter, D.I. Andersson.** 2003. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:2850-2858.
231. **Norden, C.W.H, H. Wentzel, E. Keleti.** 1979. Comparison of techniques for measurements of an *in vitro* antibiotic synergism. *J Infect Dis.* 140:629-633.
232. **Noskin, G.A.** 2005. Tigecycline: a new glycyclcycline for treatment of serious infections. *Clin Infect Dis.* 41:S303-S314.
233. **O'Neill, A.J., I. Chopra.** 2001. Use of mutator strains for characterization of novel antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:1599-1600.
234. **Ohshima, H.** 1995. Electrophoretic mobility of soft particles. *Electrophoresis.* ~~1995~~,16:1360-1363.
235. **Ohshima, H., T. Kondo.** 1991. On the electrophoretic mobility of biological cells. ~~1991~~. *Biophys Chem.* 39:191-198.
236. **Okada, Y., Y. Kasai, J. Nishimura.** 1995. The Selective Extraction and Transport of Amino Acids by Calix[4]arene-derived Esters. *Tetrahedron Lett.* 36:555-558.

237. **Oleson, F.B., C.L. Berman, J.B. Kirkpatrick, K.S. Regan, J.J. Lai, F.P. Tally.** 2000. Once-daily dosing in dogs optimizes daptomycin safety. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:2948-2953.
238. **Ong, Y.L., A. Razatos, G. Georgiou, M.M. Sharma.** 1999. Adhesion forces between *E. coli* bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir.* 15:2719-2725.
239. **Ostenson, C.G.** 1983. Effects of the biguanide Synthalin A on the pancreatic A2-cell of the guinea pig. *Exp Clin Endocrinol.* 81:255-262.
240. **Pace, J.L., G. Yang.** 2006. Glycopeptides: update on an old successful antibiotic class. *Bioch Pharmacol.* 71:968-980.
241. **Paclet, M.H., C. F. Rousseau, Y. Campion, F. Morel, A. W. Coleman.** 2005. An absence of non-specific immune response towards *para*-sulphonato-calix[n]arenes. *J Incl Phen Macro Chem.* 55:353-357.
242. **Pag, U., M. Oedenkoven, N. Papo, Z. Oren, Y. Shai, H.G. Sahl.** 2004. *In vitro* activity and mode of action of diastereomeric antimicrobial peptides against bacterial clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 53:230-239.
243. **Paterson, D.L., W.C. Ko, A. Von Gottberg.** 2004. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia : implications of production of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis.*39:31-37.
244. **Perret, F., A.N. Lazar, A.W. Coleman.** 2006. Biochemistry of the *para*-sulfonato-calix[n]arenes. *Chem. Commun.* 23:2425–2438.
245. **Perrine, D.J., P. Labthaviku, P. Georges, J.C. Lancelot, C. Saturnino, M. Robba.** 1995. Amoebicidal efficiencies of various diamidines against two strains of *Acanthamoeba polyphaga*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:339-342.
246. **Peschel, A., M. Otto, R.W. Jack, H. Kallacher, G. Jung, F. Götz.** 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to défensines, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem.* 274:8405-8410.
247. **Petersen, P.J., P. Labthaviku, C. Hal Jones, P.A. Bradford.** 2006. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother.* 57:573-576.

248. **Philippon, A., G. Arlet.** 2006. Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork! *Ann Biol Clin.* 64:37-51.
249. **Philippon, A., R. Labia, G. Jacoby.** 1989. Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 33:1131-1136.
250. **Pioletti, M., F. Schlunzen, J. Harms, R. Zarivach, M. Gluhmann, H. Avila, A. Bashan, H. Bartels, T. Auerbach, C. Jacobi, T. Hartsch, A. Yonath, F. Franceschi.** 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *Embo J.* 20:1829-1839.
251. **Pitout, J.D., N.D. Hanson, D.L. Church, K.B. Laupland.** 2004. Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M genes. *Clin Infect Dis.* 38:1736-1741.
252. **Prichard, M.N., L.E. Prichard, C. Shipman.** 1993. Strategic design and three-dimensional analysis of antiviral drug combinations. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:540-545.
253. **Quinn, B., S. Hussain, M. Malik, K. Drlica, X. Zhao.** 2007. Daptomycin inoculum effects and mutant prevention concentration with *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 60:1380-1383.
254. **Rand, K.H., H.J. Houck, P. Brown, D. Bennett.** 1993. Reproducibility of microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:613-615.
255. **Razatos, A., Y.L. Ong, M.M. Sharma, G. Georgiou.** 1998. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 95:11059-11064.
256. **Regev-Yochay, G., E. Rubinstein, A. Barzilai, Y. Carmeli, J. Kuint, J. Etienne, M. Blech, G. Smollen, A. Maayan-Metzger, A. Leavitt, G. Rahay, N. Keller.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal intensive care unit. *Emerg Infect Dis.* 11:453-456.
257. **Reverdy, M.E., M. Bes, C. Nervi, A. Martra, J. Fleurette.** 1992. Activity of four antiseptics (acriflavine, benzalkonium chloride, chlorhexidine digluconate and hexamidine diisethionate) and of ethidium bromide on 392 strains representing 26 *Staphylococcus* species. *Med Microbiol Lett.* 1:56-63.
258. **Reyes, L.P., M.R. El-Khatib, W.J. Brown, F. Smith, A.M. Lerner.** 1979. Synergy between carbenicillin and aminoglycoside (gentamicin or tobramycin) against *Pseudomonas aeruginosa*

isolated from patients with endocarditis and sensitivity of isolates to normal human serum. J Infect Dis. 140:192-202.

259. **Rieth, H.** 1962. New insight into the use of aromatic diamidines, especially of hexamidine, in the treatment of skin diseases. Fortschr Med. 30:621-623.

260. **Robicsek, A., G.A. Jacoby, D.C. Hooper.** 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Inf Dis. 6:629-640.

261. **Rochon-Edouard, S., M. Pestel-Caron, J-F. Lemeland, F. Caron.** 2000. In vitro synergistic effects of double and triple combinations of β -lactams, vancomycin, and netilmicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 44:3055-3060.

262. **Rodriguez-Bano, J., M.D. Navarro, L. Romero.** 2004. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. J Clin Microbiol. 42:1089-1094.

263. **Sahl, H.G., G. Bierbaum.** 1998. Lantibiotics : biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. Annual Rev Microbiol. 52:41-79.

264. **Sahm, D.F., M.K.Marsilio, G. Piazza.** 1999. Antimicrobial resistance in key bloodstream bacterial isolates : electronic surveillance with the Surveillance Network Database – USA. Clin Infect Dis. 29:259-263.

265. **Sahuquillo Arce, J.M., E. Colombo Gainza, A. G. Brusola, R.O. Estevez, E. Canton, M. Gobernado.** 2006. *In vitro* activity of linezolid in combination with doxycycline, fosfomycin, levofloxacin, rifampicin and vancomycin against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioterap. 19:252-257.

266. **Salmi, C., J.M. Brunel.** 2007. Therapeutic potential of cationic steroid antibacterials. Expert Opin Investig Drugs. 16:1143-1157.

267. **Sands, M., M.A. Kron, R.B. Brown.** 1985. Pentamidine: a review. Rev Infect Dis. 7:625-634.

268. **Sansone, F., M. Dudic, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai, R. Ungaro.** 2006. DNA condensation and cell transfection properties of guanidinium calixarènes: dependence on macrocycle lipophilicity, size and conformation. J Am Chem Soc. 128:14528-14536.

269. **Sansone, F., S. Barbosa, A. Casnati, D. Sciotto, R. Ungaro.** 1999. A New Chiral Rigid Cone Water Soluble Peptidocalix[4]arene and Its Inclusion Complexes with α -Amino Acids and Aromatic Ammonium Cations. *Tetrahedron Lett.* 40:4741-4744.
270. **Sansone, F., S. Barbosa, A. Casnati, M. Fabbi, A. Pochini, F. Ugozzoli, R. Ungaro.** 1998. Synthesis and Structure of Chiral Cone Calix[4]arenes Fonctionalized at the Upper Rim with L-Alanine Units. *Eur. J Org Chem.* 5:897-905.
271. **Sax, H., D. Pittet** pour le comité de redaction de Swiss-NOSO et le réseau Swiss-NOSO Surveillance. 2005. Résultats de l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales de 2004 (snip04). Swiss NOSO. 12:1-4. <http://www.chuv.ch/swiss-noso/f121a1.htm>
272. **Schatz, A., E. Bugie, S.A. Waksman.** 1944. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol.* 55:66-69.
273. **Schatz, A., S.A. Waksman.** 1944. Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Biol.* 57:244-248.
274. **Schlünzen, F., J.M. Harms, F. Franceschi, H.A.S. Hansen, H. Bartels, R. Zarivach, A. Yonath.** 2003. Structural basis for the antibiotic activity of ketolides and azalides. *Structure.* 11:328-338.
275. **Schmidt, E.J., J.S. Boswell, J.P. Walsh, M.M. Schellenberg, T.W. Winter, C. Li, G.W. Allman, P.B. Savage.** 2001. Activities of cholic-acid derived antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 47:671-674.
276. **Scott, M.G., M.R. Gold, R.E.W. Hancock.** 1999. Interaction of cationic peptides with lipoteichoic acid and Gram-positive bacteria. *Inf Immun.* 67:6445-6453.
277. **Seltzer, E., M.B. Dorr, B.P. Goldstein, M. Perry, J.A. Dowell, T. Henkel.** 2003. Dalbavancin skin and soft-tissue infection study group, one-weekly dalbavancin versus standard-of-care antimicrobial regimens for treatment of skin and soft-tissue infections. *Clin Infect Dis.* 37:1298-1303.
278. **Shafer, J.J., D.A. Goff, J.E. Mangino.** 2009. Doripenem: a new addition to the carbapenem class of antimicrobials. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 4:18-28.
279. **Shah, P.M., W. Stille.** 1983. *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains more susceptible to cefoxitin than to third generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* 11:597-598.

280. **Shahgaldian, P., L. Quattrocchi, J. Gualbert, A.W. Coleman, P. Goreloff.** 2003. AFM imaging of calixarènes based solid lipid nanoparticles in gel matrices. *Europ J Pharma Biopharma*. 55:107-113.
281. **Shahgaldian, P., M.A. Sciotti, U. Pieles.** 2008. Amino-substitued amphiphilic calixarenes: self-assembly and interactions with DNA. *Langmuir*. 24:8522-8526.
282. **Shapiro, T.A., P.T. Englund.** 1990. Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:950-954.
283. **Sharma, S., I.A. Khan, I. Ali, F. Ali, M. Kumar, A. Kumar, R.K. Johri, S.T. Abdullah, S. Bani, A. Pandey, K.A. Suri, B.D. Gupta, N.K. Satti, P. Dutt, G.N. Qazi.** 2009. Evaluation of antimicrobial, antioxydant and anti-inflammatory activities of hydroxychavicol and its potential use as an oral care agent. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:216-222.
284. **Shaw, J.E., J.R. Alattia, J.E. Verity, G.G. Prive, C.M. Yip.** 2006. Mechanisms of antimicrobial peptide action : studies of indolicidin assembly at model membrane interfaces by in situ atomic force microscopy. *J Struct Biol*. 154:42-58.
285. **Shinabarger, D.L., K.R. Marotti, R.W. Murray, A.H. Lin, E.P. Melchior, S.M. Swaney, D.S. Dunyak, W.F. Demyan, J.M. Buysse.** 1997. Mechanism of Action of Oxazolidinones: Effects of Linezolid and Eperezolid on Translation Reactions. *Antimicrob Agents Chemother*. 41:2131-2136.
286. **Shinkai, S., S. Mori, H. Koreishi, T. Tsubaki, O. Manabe.** 1986. Hexasulfonated Calix[6]arene Derivatives: A New Class of Catalysts, Surfactants, and Host Molecules. *J Am Chem Soc*. 108:2409-2416.
287. **Silverman, J.A., N. Oliver, T. Andrew, T. Li.** 2001. Resistance studies with daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:1799-1802.
288. **Silverman, J.A., N.G. Perlmutter, H.M. Shapiro.** 2003. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:2538-2544.
289. **Slee, A.M., M.A. Wuonola, R.J. McRipley, I. Zajac, M.J. Zawada, P.T. Bartholomew, W.A. Gregory, M. Forbes ~~M.~~** 1987. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: *in vitro* and *in vivo* activities of DuP105 and DuP721. *Antimicrob Agents Chemother*. 31:1791-1797.

290. **Soeiro, M.N., E.M. de Souza, C.E. Stephens, D.W. Boykin.** 2005. Aromatic diamidines as antiparasitic agents. *Expert Opin Investig Drugs*. 14:957-972.
291. **Soell, M., E. Lett, F. Holveck, M. Scholler, D. Wachsmann, J.P. Klein.** 1995. Activation of human monocytes by streptococcal rhamnose glucose polymers is mediated by CD14 antigen, and mannan binding protein inhibits TNF α release. *J Immunol*. 154:851-860.
292. **Soell, M., M. Diab, G. Haan-Archipoff, A. Beretz, C. Herbelin, B. Poutrel, J.P. Klein.** 1995. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial cells, endothelial cells, and monocytes, and induce release of cytokines. *Infect Immun*. 63:1380-1386.
293. **Sonohara, R., N. Muramatsu, H. Ohshima, T. Kondo.** 1995. Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophys Chem*. 55:273-277.
294. **Spellberg, B., R. Guidos, D. Gilbert, J. Bradley, H.W. Boucher, W.M. Scheld, J.G. Bartlett, J. Edwards.** 2008. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 46:155-164.
295. **Spicer, S.** 1950. Bacteriologic studies of the newer antibiotics: effect of combined drugs on microorganisms. *J Lab Clin Med*. 26:183-191.
296. **Stabb, E.V., J. Handelsman.** 1998. Genetic analysis of zwittermicin A resistance in *Escherichia coli*: effects on membrane potential and RNA polymerase. *Mol Microbiol*. 27:311-322.
297. **Straus, S.K., R.E. Hancock.** 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim Biophys Acta*. 1758:1215-1223.
298. **Stryjewski, M.E., W.D. O'Riordan, W.K. Lau, F.D. Pien, L.M. Dunbar, M. Vallee, V.G. Fowler, V.H. Chu, E. Spencer, S.L. Barriere, M.M. Kitt, C.H. Cabell, G.R. Corey.** 2005. Telavancin versus standard therapy for treatment of complicated skin and soft-tissue infections due to Gram-positive bacteria. *Clin Infect Dis*. 40:1601-1607.
299. **Swaney, S.M., H. Aoki, M.C. Ganoza, D.L. Shinabarger.** 1998. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 42:3251-3255.

300. **Tatnall, F.M., I.M. Leigh, J.R. Gibson.** 1990. Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. *Skin Pharmacol.* 3:157-163.
301. **Taubes, G.** 2008. The bacteria fight back. *Science.* 321:356-361.
302. **Teepe, R.G., E.J. Koebrugge, C.W. Lowik, P.L. Petit, R.W. Bosboom, I.M. Twiss, H. Boxma, B.J. Vermeer, M. Ponc.** 1993. Cytotoxic effects of topical antimicrobial and antiseptic agents on human keratinocytes in vitro. *J Trauma.* 35:8-19.
303. **Tian, C., E. Tetreault, C.K. Huang, T.E.S. Dahms.** 2006. Electrostatic interactions of colicin E1 with the surface of *Escherichia coli* total lipid. *Bioch Biophys Acta.*1738:693-701.
304. **Timurkaynak, F., F. Can, O.K. Azap, M. Demirbilek, H. Arslan, S.O. Karaman.** 2006. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents.* 27:224-228.
305. **Touhami, A., M.H. Jericho, J.M. Boyd, T.J. Beveridge.** 2006. Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* pili by using atomic force microscopy. *J Bacteriol.* 188:370-377.
306. **Touhami, A., M.H. Jericho, T.J. Beveridge.** 2004. Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 186:3286-3295.
307. **Trémolières, F., R. Garraffo, O. Lortholary.** 2005. Nécessité d'approches alternatives dans les stratégies d'évaluation des nouveaux antibiotiques antibactériens. *Med Mal Inf.* 35:S229-S235.
308. **Vaara, M.** 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev.* 56:395-411.
309. **Vaara, M.** 1996. Lipid A: target for antibacterial drugs. *Science.* 274:939-940.
310. **Vaara, M., J. Fox, G. Loidl, O. Siikanen, J. Apajalahti, F. Hansen, N. Frimodt-Moller, J. Nagai, M. Takano, T. Vaara.** 2008. Novel polymyxin derivatives carrying only three positive charges are effective antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:3229-3236.
311. **Vadillo-Rodriguez, V., H.J. Busscher, W. Norde, J. de Vries, R.J.B. Dijkstra, I. Stokroos, H.C. Van der Mei.** 2004. Comparaison of atomic force microscopy interaction forces between bacteria

and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods. *Appl Env Microbiol.* 70:5441-5446.

312. **Van Bambeke, F., D. Tyteca, Y. Ouadrhiri, P.M. Tulkens.** 1999. Optimisation des traitements antiabctériens sur base de propriétés pharmacodynamiques des antibiotiques. *Louvain Med.* 118:43-63.

313. **Van Bambeke, F., Y. Van Laethem, P. Courvalin, P.M. Tulkens.** 2004. Glycopeptides antibiotics: from conventional molecules to new derivatives. *Drugs.* 64:913-936.

314. **Van der Mei, H.C., H.J. Bussher.** 2001. Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations. *Appl Env Micr.* 67:491-494.

315. **Van Loosdrecht, M.C.M., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, A.J.B. Zehnder.** 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl Env Microbiol.* 53:1898-2001.

316. **Varga, J.H., T.C. Wolf, H.G. Jensen, V.C. Parmley, J.J. Rowsey.** 1993. Combined treatment of *Acanthamoeba* keratitis with propamidine, neomycin, and polyhexamethylene biguanide. *Am J Ophthamol.* 15:466-470.

317. **Velegol, S.B., B.E. Logan.** 2002. Contributions of bacterial surface polymers, electrostatics, and cell elasticity to the shape of AFM force curves. *Langmuir.* 18:5256-5262.

318. **Verbelen, C., V. Dupres, F.D. Menozzi, D. Raze, A.R. Baulard, P. Hols, Y.F. Dufrêne.** 2006. Ethambutol-induced alterations in *Mycobacterium bovis* BCG imaged by atomic force microscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* 264:192-197.

319. **Vickers, A.A., A.J. O'Neill, I. Chopra.** 2007. Emergence and maintenance of resistance to fluoroquinolones and coumarins in *Staphylococcus aureus*: predictions from in vitro studies. *J Antimicrob Chemother.* 60:269-273.

320. **Vollmer, W., D. Blanot, M.A. de Pedro.** 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Lett.* 32:146-167.

321. **Walsh, S.E., J.Y. Maillard, A.D. Russell, C.E. Catrenich, D.L. Charbonneau, R.G. Bartolo.** 2003. Activity and mechanism of action of selected biocidal agents on Gram-positive and –negative bacteria. *J Appl Microbiol.* 94:240-247.

322. **Wang, J., S.M. Soisson, K. Young, W. Shoop, S. Kodali, A. Galgoci, R. Painter, G. Parthasarathy, Y.S. Tang, R. Cummings, S. Ha, K. Dorso, M. Motyl, H. Jayasuriya, J. Ondeyka, K. Herath, C. Zhang, L. Hernandez, J. Allocco, A. Basilio, J.R. Tormo, O. Genilloud, F. Vicente, F. Pelaez, L. Colwell, S.H. Lee, B. Michael, T. Felcetto, C. Gill, L.L. Silver, J.D. Hermes, K. Bartizal, J. Barrett, D. Schmatz, J.W. Becker, D. Cully, S.B. Singh.** 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature*. 41:358-61.
323. **Wareham, D.W., D.C. Bean.** 2006. In vitro activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. *An Clin Microbiol Antimicrob*.5:10-15.
324. **Warshakoon, H.J., M.R. Burns, S.A. David.** 2009. Structure-activity relationships of antimicrobial and lipoteichoic acid-sequestering properties in polyamine sulfonamides. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:57-62.
325. **Wehrli, W., F. Knusel, K. Schmid, M. Staehelin.** 1968. Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *PNAS*. 61:667-673.
326. **Weiss, W.J., P.J. Petersen, N.V. Jacobus, Y.I. Lin, P. Bitha, R.T. Testa.** 1999. In vitro activities of aminomethyl-substituted analogs of novel tetrahydrofuranyl carbapenems. *Antimicrob Agents Chemoter*. 43:454-459.
327. **Werbovetz, K.** 2006. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr Opin Investig Drugs*. 7:147-157.
328. **Weyerman, J., D. Lochmann, A. Zimmer.** 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. ~~2005~~ *Int J Pharmaceut*. 288:369-376.
329. **White, R., D.S. Burgess, M. Manduru, J.A. Bosso.** 1996. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E test. *Antimicrob Agents Chemother*. 40:1914-1918.
330. **Wilcox, M.H.** 2005. Update on linezolid: the first oxazolidinone antibiotic. *Expert Opin Pharmacother*. 6:2315-2326.
331. **Wilkinson, S.G.** 1983. Composition and structure of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*. 5:S941-S949.

332. **Wilson, J.R., J.G. Mills, I.D. Prather, S.D. Dimitrijevic.** 2005. A toxicity index of skin and wound cleansers used on in vitro fibroblasts and keratinocytes. *Adv Skin Wound Care*. 18:373-378.
333. **Wootton, M., A.J. Hedges, K.E. Bowker, H.A. Holt, D.S. Reeves, A.P. McGowan.** 1995. A critical assessment of the agar dilution checkerboard technique for studying in vitro antimicrobial interactions using a representative beta-lactam, aminoglycoside and fluoroquinolone. *J Antimicrob Chemother*. 35:569-576.
334. **Wu, M., E. Maier, R. Benz, R.E. Hancock.** 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 38:7235-7242.
335. **Wu, W., D. Sil, M.L. Szostak, S.S. Malladi, H.J. Warshakoon, M.R. Kimbrell, J.R. Cromer, S.A. David.** 2009. Structure-activity relationships of lipopolysaccharide sequestration in guanyldiazide-bearing lipopolyamines. *Bioorg Med Chem*. 17:709-715.
336. **Xiao, Y.H., J.H. Chen, M., Fang, X.D. Xing, H. Wang, Y.J. Wang, F. Li.** 2008. Antibacterial effects of three experimental quaternary ammonium salts (QAS) monomers on bacteria associated with oral infections. *J Oral Sci*. 50:323-327.
337. **Xiong, L., Y. Korkhin, A.S. Mankin.** 2005. Binding Site of the Bridged Macrolides in the *Escherichia coli* Ribosome. *Antimicrob Agents Chemother*. 49:281-288.
338. **Yalcindag, O.N.** 1955. Differentiation of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline. *Am J Pharm Sci Support Public Health*. 127:362-364.
339. **Yang, W., D.P. Otto, W. Liedenberg, M.M. de Villiers.** 2008. Effect of para-sulfonato-calix[n]arenes on the solubility, chemical stability, and bioavailability of a water insoluble drug nifedipine. *Curr Drug Discov Technol*. 5:129-139.
340. **Yao, X., J. Walter, S. Burke, S. Stewart, M.H. Jericho, D. Pink, R. Hunter, T.J. Beveridge.** 2002. Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria. *Colloids Surf B*. 23:213-230.
341. **Yokoyama, T., M. Sugai, M. Ohara, Y. Imamura.** 2007. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Nippon Rinsho*. 65:418-422.

342. **Yoon, J., C. Urban, C. Terzian, N. Mariano, J.J. Rahal.** 2004. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampicin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:753-757.
343. **Yu, W.Y., L.X. Yang, J.S. Xie, L. Zhou, X.Y. Jiang, D.X. Zhu, M. Muramatsu, M.W. Wang.** 2008. Derivatives of aryl-4-guanidinomethylbenzoate and N-aryl-4-guanidinomethylbenzamide as new antibacterial agents: synthesis and bioactivity. *Acta Pharmacol Sin.* 29:267-277.
344. **Zakeri, B., G.D. Wright.** 2008. Chemical biology of tetracycline antibiotics. *Biochimie Cell Biol.* 86:124-136.
345. **Zanetti, G., F. Bally, G. Greub.** 2003. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients : a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3442-3447.
346. **Zetola, N., J.S. Francis, E.L. Nuermberger, W.R. Bishai.** 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : an emerging threat. *Lancet Infect Dis.* 5:275-286.
347. **Zhao, X., K. Drlica.** 2001. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants : a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis.* 33:S127-S156.
348. **Zhong, P., V. Shortridge.** 2001. The emerging new generation of antibiotic: ketolides. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 1:125–131.
349. **Zinke, S.A., E. Ziegler, E. Martinowitz, H. Pichelmayer, M. Tomio, H. Wittman-Zinke, S. Zwanziger.** 1944. *Chem Ber.* 77:264-272.
350. **Zinner, S.H., D. Gilbert, I. Y. Lubenko, K. Greer, A.A. Firsov.** 2008. Selection of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in an *in vitro* dynamic model: protective effect of doxycycline. *J Antimicrob Chemother.* 61:629-635.
351. **Zinner, S.H., I.Y. Lubenko, D. Gilbert, K. Simmons, X. Zhao, K. Drlica, A.A. Firsov.** 2003. Emergence of resistant *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* dynamic model that stimulates moxifloxacin concentrations inside and outside the mutant selection window: related changes in susceptibility, resistance frequency, and bacterial killing. *J Antimicrob Chemother.* 52:616-622.
352. **Zorko, M., R. Jerala.** 2008. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 62:730-737.

ANNEXES

ANNEXE 1. ANTIBIOGRAMME DES ISOLATS CLINIQUES

UTILISES POUR LES TESTS DE SYNERGIE

EcR1 : *Escherichia coli* pénicillinase

Nature du prélèvement : hémoculture périphérique

Identification et antibiogramme VITEK2 + diffusion disques

Juillet 2006		
Antibiotiques	CMI mg/L	Résultats
Amoxicilline	≥ 32	Résistant
Amox + ac.clavulanique	4	Sensible
Ticarcilline	≥ 128	Résistant
Pipéracilline	≤ 8	Sensible
Piper + tazobactam	≤ 4	Sensible
C1G	4	Sensible
Céfoxitine	≤ 4	Sensible
Céfotaxime	≤ 1	Sensible
Ceftazidime	≤ 1	Sensible
Imipénème	≤ 1	Sensible
Aztréonam		
Tobramycine	≤ 1	Sensible
Gentamicine	≤ 1	Sensible
Amikacine	≤ 2	Sensible
Netilmicine	≤ 1	Sensible
Minocycline		
Colistine		
Triméthoprim – Sulfamét.	≤ 20	Sensible
Acide nalidixique	≤ 2	Sensible
Norfloxacine	$\leq 0,5$	Sensible
Ofloxacine	$\leq 0,25$	Sensible
Péfloxacine		
Ciprofloxacine	$\leq 0,25$	Sensible
Rifampicine		
Fosfomycine		
Nitrofurantoïne	≤ 16	Sensible
Céfépime		

EcR2 : *Escherichia coli* Céphalosporinase hyperproduite

Nature du prélèvement : ECBU

Identification et antibiogramme VITEK1 (Brabois)

Janvier 2007				
Antibiotiques	D	Dmin Dmax	Résultats	CMI mg/L
Amoxicilline			Résistant	≥ 32
Amox + ac.clavulanique			Résistant	≥ 32
Ticarcilline			Intermédiaire	32
C1G			Résistant	≥ 64
Céfoxitine	11	15-22	Résistant	
Céfotaxime	24	15-21	Intermédiaire	
Ceftazidime	20	15-21	Intermédiaire	
Imipénème			Sensible	≤ 4
Tobramycine	10	16-18	Résistant	
Gentamicine	12	16-18	Résistant	
Netilmicine	21	19-21	Sensible	≤ 1
Triméthoprim – Sulfamét.			Intermédiaire	160
Acide nalidixique			Résistant	≥ 32
Péfloxacin			Résistant	≥ 8
Nitrofurantoïne			Sensible	≤ 25

EcR3 : *Escherichia coli* BLSE

Nature du prélèvement : hémoculture périphérique

Identification et antibiogramme VITEK2

Juin 2007			
<i>Antibiotiques</i>	D	Dmin Dmax	Résultats
Amoxicilline	6	14-21	Résistant
Amox + ac.clavulanique	16	14-21	Intermédiaire
Ticarcilline	6	18-22	Résistant
Pipéracilline	13	12-20	Intermédiaire
Piper + tazobactam			<i>Intermédiaire</i>
C1G	6	12-18	Résistant
Céfoxitine			Intermédiaire
Céfotaxime	19	15-21	Intermédiaire
Imipénème	27	17-22	Sensible
Tobramycine	6	14-16	Résistant
Gentamicine	12	14-16	Résistant
Amikacine	17	15-17	Sensible
Netilmicine	10	17-19	Résistant
Minocycline	21	17-19	Sensible
Colistine	16	15	Sensible
Triméthoprim – Sulfamét.	6	10-16	Résistant
Péfloxacin	23	16-22	Sensible
Ciprofloxacine	25	19-22	Sensible
Rifampicine	15	14-19	Intermédiaire
Fosfomycine	23	14	Sensible
Céfépime	24	15-21	Intermédiaire

PaR2 : *Pseudomonas aeruginosa* groupe O3

Nature du prélèvement : hémoculture périphérique

Identification et antibiogramme par diffusion disques

Antibiotiques	Diamètre	Mars 2007	
		Dmin-Dmax	Résultats
Ticar + ac. clavulanique	10	18-22	Résistants
Ticarcilline	10	18-22	Résistant
Pipéracilline	22	12-18	Sensible
Piper + tazobactam	22	14-19	Sensible
Ceftazidime	23	15-21	Sensible
Aztréonam	16	17-23	Résistant
Imipénème	27	17-22	Sensible
Tobramycine	24	14-16	Sensible
Gentamicine	21	14-16	Sensible
Amikacine	22	15-17	Sensible
Nétilmicine	19	17-19	Sensible
Minocycline	6	17-19	Résistant
Colistine	20	15-15	Sensible
Triméthoprim – Sulfamét.	6	10-16	Résistant
Péfloxacin	8	16-22	Résistant
Rifampicine	25	19-22	Résistant
Fosfomycine	13	14-19	Sensible
Ciprofloxacine	18	14-14	Sensible
Céfépime	19	15-21	Intermédiaire

PaR3 : *Pseudomonas aeruginosa* groupe O3

Nature du prélèvement : crachat

Identification et antibiogramme par VITEK2

Juin 2007		
Antibiotiques	CMI	Résultats
Ticar + ac. clavulanique	≥ 128	Résistant
Ticarcilline	≥ 128	Résistant
Pipéracilline	≥ 128	Résistant
Piper + tazobactam	≥ 128	Résistant
Ceftazidime	4	Sensible
Aztréonam	16	Sensible
Imipénème	≥ 16	Résistant
Méropénème	≥ 16	Résistant
Tobramycine	≥ 16	Résistant
Gentamicine	≥ 16	Résistant
Amikacine	4	Sensible
Minocycline	4	Résistant
Colistine	≤ 0,5	Sensible
Trimétoprime – Sulfamét.	≥ 320	Résistant
Péfloxacine	4	Intermédiaire
Ciprofloxacine	1	Sensible
Céfépime	16	Intermédiaire

PaR5 : *Pseudomonas aeruginosa* muqueux

Nature du prélèvement : PV

Identification et antibiogramme par diffusion disques

Antibiotiques	Diamètre	Octobre 2007	
		Dmin-Dmax	Résultats
Ticar + ac. clavulanique	40	18-22	<i>Sensible</i>
Ticarcilline	32	18-22	Sensible
Pipéracilline	33	12-18	Sensible
Piper + tazobactam	40	14-19	Sensible
Ceftazidime	32	15-21	Sensible
Aztréonam	33	17-23	Sensible
Imipénème	25	17-22	Sensible
Méropénème	34	15-20	Sensible
Tobramycine	28	14-16	Sensible
Gentamicine	25	14-16	Sensible
Amikacine	27	15-17	Sensible
Nétilmicine	28	17-19	Sensible
Minocycline	11	17-19	Résistant
Colistine	23	15-15	Sensible
Triméthoprim – Sulfamét.	6	10-16	Résistant
Norfloxacin	17	22-25	Résistant
Ofloxacin	11	22-25	Résistant
Ciprofloxacine	30	19-22	Sensible
Rifampicine	13	14-19	Résistant
Fosfomycine	30	14-14	Sensible
Céfépime	32	15-21	Sensible

SaR1 : *Staphylococcus aureus* Méti R

Nature du prélèvement : hémoculture périphérique

Identification et antibiogramme VITEK2

Antibiotiques	Février 2006			Juillet 2006	
	D	Dmin Dmax	Résultats	CMI mg/L	Résultats
Pénicilline G	28	9-29	Résistant	$\geq 0,5$	Résistant
Oxacilline				≥ 8	Résistant
Kanamycine	20	15-17	Sensible	≤ 4	Sensible
Tobramycine	22	14-16	Sensible	≤ 1	Sensible
Gentamicine	23	14-16	Sensible	$\leq 0,5$	Sensible
Chloramphénicol	25	19-23	Sensible		
Minocycline	27	17-19	Sensible		
Erythromycine	25	17-22	Sensible	$\leq 0,25$	Sensible
Lincomycine	24	17-21	Sensible	≤ 1	Sensible
Pristinamycine	25	19-22	Sensible	$\leq 0,5$	Sensible
Quinupristine-dalfopristine				$\leq 0,25$	Sensible
Triméthoprimé – Sulfamét.	26	10-16	Sensible	≤ 10	Sensible
Ofloxacin	24	16-22	Sensible	1	Sensible
Acide fusidique	28	15-22	Sensible	$\leq 0,5$	Sensible
Vancomycine			Sensible	≤ 1	Sensible
Teicoplanine			Sensible	$\leq 0,5$	Sensible
Rifampicine	30	14-29	Sensible	$\leq 0,5$	Sensible
Fosfomycine	40	14	Sensible	≤ 8	Sensible
Linézolide	29	24-28	Sensible	2	Sensible
Minocycline				$\leq 0,5$	Sensible
Nitrofurantoïne				≤ 16	Sensible

Recherche du gène *mecA* par technique PCR : POSITIVE

SaR3 : *Staphylococcus aureus* Méti R

Nature du prélèvement : hémoculture

Identification et antibiogramme VITEK2

Antibiotiques	Mars 2007		
	D	Dmin Dmax	Résultats
Pénicilline G	26	9-29	Résistant
Oxacilline			
Kanamycine	6	15-17	Résistant
Tobramycine	6	14-16	Résistant
Gentamicine	20	14-16	Sensible
Chloramphénicol	6	19-23	Résistant
Minocycline	26	17-19	Sensible
Erythromycine	25	17-22	Sensible
Lincomycine	23	17-21	Sensible
Pristinamycine	23	19-22	Sensible
Triméthoprim – Sulfamét.	27	10-16	Sensible
Ofloxacin	6	16-22	Résistant
Acide fusidique	29	15-22	Sensible
Vancomycine			Sensible
Teicoplanine			Sensible
Rifampicine	31	14-29	Sensible
Fosfomycine	26	14	Sensible
Linézolide	26	24-28	Sensible

Recherche du gène *mecA* par technique PCR : POSITIVE

SaR4 : *Staphylococcus aureus* Méti R

Nature du prélèvement : plaie

Identification et antibiogramme VITEK2

Juin 2007				
Antibiotiques	D	Dmin Dmax	Résultats	CMI mg/L
Pénicilline G			Résistant	
Oxacilline			Résistant	≥ 8
Kanamycine	7	15-17	Résistant	
Tobramycine	6	20-20	Résistant	
Gentamicine	21	20-20	Sensible	
Chloramphénicol			Sensible	8
Tétracycline			Sensible	≤ 1
Minocycline			Sensible	≤ 4
Erythromycine			Résistant	≥ 8
Lincomycine			Résistant	≥ 16
Pristinamycine			Sensible	≤ 2
Triméthoprim – Sulfamét.			Sensible	≤ 10
Ofloxacin			Résistant	≥ 8
Nitrofurantoïne			Sensible	≤ 25
Acide fusidique			Sensible	≤ 1
Vancomycine			Sensible	1
Teicoplanine			Sensible	≤ 4
Rifampicine			Sensible	≤ 1
Fosfomycine			Résistant	≥ 64

Recherche du gène *mecA* par technique PCR : POSITIVE

TITRE

De la genèse d'une nouvelle classe d'antibactériens à base de polyphénols cycliques de type calixarène. Etudes moléculaire(s), cellulaire(s), et structurale(s) en vue de l'identification des cibles d'action : le cas du para-guanidinoéthylcalix[4]arène.

Soutenance prévue le 03 juin 2009

Par Marion GRARE

RESUME

Trois inquiétudes, actuellement, dans le monde de la microbiologie médicale : la fréquence des infections nosocomiales, d'origine bactérienne dans plus de 60% des cas, la multiplication et la dissémination des résistances bactériennes, mais aussi la pénurie annoncée en molécules antibiotiques et antiseptiques. Il est indispensable de trouver de nouvelles molécules antibactériennes, avec un mécanisme d'action innovant, non susceptibles aux mécanismes de résistance actuellement identifiés chez les bactéries.

Nous présentons dans cette étude, l'évaluation d'une molécule innovante, calixarène purement synthétique, le para-guanidinoéthylcalix[4]arène (Cx1). Cette molécule se caractérise par une activité antibactérienne à large spectre (bactéries à Gram + et à Gram -), conservée sur des isolats cliniques tels que les SARM, les ERG ou les Entérobactéries productrices de BLSE ; activité d'autant plus intéressante qu'elle est conjuguée à une absence de cytotoxicité *in vitro* sur deux lignées de cellules eucaryotes (HaCaT et MRC-5). L'activité du Cx1 est rapidement bactéricide (< 4 h), de type concentration-dépendante, quelque soit la souche testée (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*). Des interactions de type synergie sont obtenues avec de nombreux antibiotiques, de familles différentes (β -lactamines, fluoroquinolones, rifampicine, acide fusidique, tigécycline...) ; aucun antagonisme n'a été observé.

Le Cx1 n'induit pas la sélection de mutants résistants *in vitro*, après 30 passages, pour *S. aureus* et *P. aeruginosa* (modifications de production du pigment pyocyanique). Pour *E. coli*, des mutants résistants sont sélectionnés au delà de 15 passages, avec modification de la taille et de l'hétérogénéité de la structure de la population (par cytométrie en flux), et mise en évidence de formes filamenteuses qui posent question quant à une éventuelle activation du système SOS. Après arrêt de la pression de sélection créée par le Cx1 (10 passages), nous n'avons pas obtenu de retour à la CMI, ce qui implique une certaine stabilité des mécanismes de résistance.

Diverses techniques ont été mises en œuvre afin d'appréhender la ou les cible(s) d'action du Cx1. La combinaison de la microélectrophorèse (détermination de la mobilité électrophorétique), et de la microscopie à force atomique (mode image, mode spectroscopie de force), nous a permis de montrer à une double échelle, une altération des propriétés membranaires : modification de la charge et/ou de la souplesse hydrodynamique (échelle micrométrique), altérations de la paroi et augmentation de la rigidité bactérienne (échelle nanométrique). Nous avons confirmé les modifications de la perméabilité membranaire par association de la cytométrie en flux et du marquage par deux fluorochromes (kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting®) : augmentation du marquage de *E. coli* par IP et SYTO-9 après 24 h d'incubation en présence de Cx1. Par ailleurs, nous avons mis en évidence la capacité du Cx1 à se lier au LPS (*E. coli*, *P. aeruginosa*) et aux LTA (*S. aureus*) par test *in vitro* du déplacement de la dansyl-polymyxine (diminution maximale de la fluorescence : environ 80%).

En conclusion, le Cx1 apparaît comme un composé prometteur en tant que nouvel antibactérien, et semble posséder une ou des cibles pariétales. De nombreuses pistes de recherche restent ouvertes : nature des interactions avec la paroi, recherche d'une éventuelle cible intracellulaire, tests de génotoxicité et exploration des mécanismes à l'origine d'une induction du système SOS... avant l'étape suivante : l'évaluation *in vivo*.

MOTS CLES : Calixarènes, activité antibactérienne, spectre d'activité, cytotoxicité, microélectrophorèse, microscopie à force atomique, cytométrie en flux et perméabilité membranaire, séquestration LPS/LTA

TITLE

A new family of synthetic antibacterials with calixarene-based structure. Molecular, cellular and structural studies in order to investigate the mechanisms of action : interest of para-guanidinoethylcalix[4]arene.

Presentation planned on June 3rd, 2009

By Marion GRARE

ABSTRACT

The progressive reduction of the therapeutic effectiveness of the available antibiotics and antiseptics as a result of the spread of antimicrobial resistance underlines the urgency of the development of new classes of drugs for the treatment of infectious diseases. The major challenge is to find drugs that act against multiple multidrug-resistant strains, with a real new mechanism of action.

The work presented here is an evaluation of the potential of the para-guanidinoethylcalix[4]arene (Cx1), as a new innovative antibacterial. Cx1 belongs to calixarene family, compounds obtained by chemical synthesis, which possess no equivalent in Nature. We have demonstrated that Cx1 possess a broad-spectrum antibacterial activity (against Gram-positive, and Gram-negative strains), activity conserved against multidrug-resistant isolates such as MRSA, VRE or ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. This activity is all the more interesting as it is conjugated to an absence of cytotoxicity (*in vitro* assays on two cell lines : HaCaT and MRC-5). The activity of Cx1 is rapidly bactericidal, concentration-dependant, whatever strains tested (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*). Checkerboard studies have underlined a large number of synergies with antibiotics from various classes (β -lactams, fluoroquinolones, rifampicin, fusidic acid, tigecycline...) ; no antagonism have been observed.

In vitro, Cx1 was not able to select resistant mutants with *S. aureus* and *P. aeruginosa* (modification of pyocyanins production). For *E. coli*, we have observed resistant mutants beyond 15 passages, with modification of size and structure heterogeneity of the population (by flow cytometry). *E. coli* presented filamentous forms, with altered membrane permeability, and an activation of SOS system have been suggested, without confirmation. Mechanism conferring resistance seemed to be stable: no return to CMI was observed after stop pression of selection.

Various techniques were used in order to elucidate mechanism of action of Cx1. Use of microelectrophoresis (electrophoretic mobility) and atomic force microscopy (image and force spectroscopy modes) have permitted us to show a modification of bacterial cell wall properties: (i) at micrometric scale (modification of charge density and/or hydrodynamic properties); (ii) at nanometric/newton scale (loss of membrane integrity, increase of bacterial turgor pressure). We have confirmed modifications of membrane permeability by use of flow cytometry combined with stained by two fluorochroms (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting[®] kit). After 24 h of exposure to Cx1, *E. coli* appeared highly green and red fluorescent (increase of stain by SYTO9 and IP). Moreover, we have showed that Cx1 was able to interact strongly with LPS (*E. coli*, *P. aeruginosa*) and LTA (*S. aureus*) with dansyl-polymyxin assay *in vitro* (fluorescence decrease up to 80%).

In conclusion, Cx1 appears as a good candidate as new antibacterial or adjuvant in anti-infectious therapy. Of numerous research ways remain to be investigated: type of interactions with bacterial cell wall, research of an intracellular target, genotoxicity assay and better understanding of mechanism of SOS system activation... before ultimate state: *in vivo* evaluation.

KEYWORDS : Calixarenes, antibacterial activity and spectrum, cytotoxicity, mechanisms of action (electrophoretic mobility, atomic force microscopy, flow cytometry and membrane permeability, interaction with LPS and LTA)