

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Laboratoire pharmacologie des anti-infectieux (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Pharmacie

Présentée par :
Alexia Chauzy

Evaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique in vitro et in vivo de l'association aztréonam-avibactam

Directeur(s) de Thèse :
William Couet, Nicolas Grégoire

Soutenue le 21 septembre 2018 devant le jury

Jury :

Président	Sandrine Marchand	Maître de conférences, Université de Poitiers
Rapporteur	France Mentré	Professeur, Université Paris Diderot
Rapporteur	Peggy Gandia	Professeur, Université de Toulouse
Membre	William Couet	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Membre	Nicolas Grégoire	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	Marylore Chenel	Docteur en pharmacie, Laboratoires Servier
Membre	Bruno Francois	Docteur, Université de Limoges
Membre	Shampa Das	Senior lecturer, University of Liverpool

Pour citer cette thèse :

Alexia Chauzy. *Evaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique in vitro et in vivo de l'association aztréonam-avibactam* [En ligne]. Thèse Pharmacie. Poitiers : Université de Poitiers, 2018. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

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

Ecole Doctorale : n°524 Biosanté

Secteur de Recherche : Pharmacie

Présentée par :

Alexia CHAUZY

Evaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique *in vitro* et *in vivo*
de l'association aztréonam-avibactam

Directeurs de Thèse :

Professeur William COUET

Docteur Nicolas GREGOIRE

Soutenue le 21 septembre 2018

devant la Commission d'Examen

JURY

Professeur France MENTRE
Professeur Peggy GANDIA
Docteur Marylore CHENEL
Docteur Shampa DAS
Docteur Bruno FRANÇOIS
Professeur Sandrine MARCHAND
Professeur William COUET
Docteur Nicolas GREGOIRE

Université Paris Diderot
Université Toulouse III
Laboratoires Servier
Université de Liverpool
Université de Limoges
Université de Poitiers
Université de Poitiers
Université de Poitiers

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

Remerciements

Au Pr France Mentré et au Pr Peggy Gandia, pour l'honneur que vous me faites en acceptant de rapporter cette thèse. Hommages respectueux.

Au Dr Marylore Chenel, pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Mon passage dans votre département, il y a quelques années, m'a donné le goût de la recherche en pharmacocinétique et m'a donné envie de poursuivre dans cette voie en faisant une thèse. Sincères remerciements.

Au Dr Shampa Das et au Dr Bruno François qui me font l'honneur d'évaluer ce travail. Sincères remerciements.

Au Pr William Couet, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance et accueillie au sein de votre unité, pour m'avoir guidée tout au long de cette thèse, pour vos précieux conseils, et enfin pour me donner l'opportunité de pouvoir continuer sur d'autres projets après cette thèse. Soyez assuré de toute ma reconnaissance.

Au Dr Nicolas Grégoire, mon co-directeur de thèse, pour tout ce que tu m'as appris, tes conseils, ta disponibilité et les discussions très enrichissantes que nous avons pu avoir. Sois assuré de toute ma reconnaissance.

Au Pr Sandrine Marchand, qui a été la première à me faire découvrir la pharmacocinétique à la fac et qui m'a donné envie de travailler dans ce domaine. J'ai eu le plaisir de travailler avec toi sur l'étude de microdialyse, je te remercie pour ton aide, pour ta rigueur et tes conseils.

A tous les membres du labo pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur qui ont rendu ces trois années de thèse des plus agréables. Je remercie particulièrement toutes celles et ceux qui m'ont aidée durant cette thèse et notamment pour la partie expérimentale : Isabelle pour la partie expérimentation animale, Patrice, Christophe et Julian pour la partie analytique, Julien pour la partie microbio et Emma pour la partie microbio également mais surtout les soirées de folie dans le L2 ! (encore merci d'être venue aussi tard).

A tous les étudiants rencontrés au cours de cette thèse : Matthieu, Sophie, Barbara, Marisa, Betty, Hari, Shachi, Vincent, Romain, Alexis, Etienne, Kévin, Chantal, Grace, Rana, Karin pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble.

A Bruna, mon binôme de choc, pour tes conseils, ton aide précieuse mais également tous nos fous rires.

Aux copains, Julien, Sophie, Elo, Bastien et Eric qui n'ont pas toujours compris ce que je faisais mais qui sont toujours là quand il le faut.

A mes proches et ma famille, et spécialement mes parents et mon frère pour votre amour, votre présence et vos encouragements.

A Clément pour ton amour, ton soutien et surtout ta patience.

A Jean-Luc

A Carmen

TABLE DES MATIERES

Liste des publications	5
Liste des communications.....	6
Liste des abréviations	7
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	10
INTRODUCTION	11
1. <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> RESISTANTES AUX CARBAPENEMES.....	13
1.1. <i>Epidémiologie</i>	13
1.2. <i>Mécanismes de résistance des ERC</i>	14
1.2.1. Classification des β -lactamases	15
1.2.2. Imperméabilité membranaire et expression de β - lactamases.....	17
1.2.3. Production de carbapénémases	18
2. LUTTE CONTRE LES ERC.....	21
2.1. <i>Traitements antibiotiques disponibles</i>	21
2.2. <i>Associations β-lactamine-inhibiteur de β-lactamases</i>	21
2.2.1. Inhibiteurs de β -lactamases classiques	22
2.2.2. Association aztréonam-avibactam : Projet Combacte-Care.....	24
2.2.2.1. Aztréonam	25
2.2.2.2. Avibactam.....	27
2.2.3. Autres inhibiteurs de β -lactamases en cours de développement.....	35
2.2.3.1. Les diazabicyclooctanones	35
2.2.3.2. Les dérivés de l'acide boronique	38
2.2.3.3. Les inhibiteurs de métallo- β -lactamases.....	40
3. PHARMACOCINETIQUE DES ANTIBIOTIQUES AU NIVEAU DU SITE INFECTIEUX	45
Article I (revue) : Microdialysis as a way to measure antibiotics concentration in tissues...	46
4. PHARMACOCINETIQUE/PHARMACODYNAMIE DES ANTIBIOTIQUES	67
4.1. <i>PK/PD des antibiotiques en monothérapie</i>	67
4.1.1. Concentration minimale inhibitrice.....	67
4.1.2. Indices PK/PD.....	68
4.1.3. Modélisation PK/PD semi-mécanistiques.....	71
4.1.3.1. Etude de cinétique de bactéricidie.....	71

4.1.3.2. Structure générale des modèles PK/PD des antibiotiques.....	73
4.2. PK/PD des associations d'antibiotiques.....	74
4.2.1. Approche des <i>checkerboard</i>	75
4.2.2. Indices PK/PD lors d'associations d'antibiotiques	76
4.2.3. Modélisation PK/PD semi-mécanistique	77
4.3. PK/PD des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases	80
4.3.1. Approche des <i>checkerboard</i>	80
4.3.2. Indices PK/PD lors des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases	80
4.3.3. Modélisation PK/PD semi-mécanistique	81
OBJECTIFS DE LA THESE	83
TRAVAUX PERSONNELS	84
Article II : Microdialysis Study of Aztreonam-Avibactam Distribution in Peritoneal Fluid and Muscle of Rats with or without Experimental Peritonitis.....	84
Article III : Pharmacodynamic Modeling of β -lactam - β -lactamase Inhibitor Checkerboard Data: Illustration with Aztreonam-Avibactam	102
Article IV : Semi-mechanistic Pharmacodynamic Modeling of Aztreonam-Avibactam Combination to Understand its Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria....	113
DISCUSSION	154
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	167
ANNEXES.....	169
Annexe 1 : Fonctions d'interaction pour les associations d'agents antimicrobiens	169
Annexe 2 : Autorisations de reproduction des figures.....	178
REFERENCES.....	182

Liste des publications

Marchand S., **Chauzy A.**, Dahyot-Fizelier C., Couet W. (2016). Microdialysis as a way to measure antibiotics concentration in tissues. Pharmacological research.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.06.001>

Chauzy A., Lamarche I., Adier C., Couet W., Marchand S. (2018) Microdialysis Study of Aztreonam-Avibactam Distribution in Peritoneal Fluid and Muscle of Rats with or without Experimental Peritonitis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01228-18>

Chauzy A., Buyck J., de Jonge B.L.M., Marchand S., Grégoire N., Couet W. (2018) Pharmacodynamic modeling of β -lactam/ β -lactamase inhibitor checkerboard data: illustration with aztreonam-avibactam. Soumis à Clinical Microbiology and Infection.

Chauzy A., Gaelzer Silva Torres B., Buyck J., de Jonge B.L.M., Adier C., Marchand S., Couet W., Grégoire N. (2018) Semi-mechanistic pharmacodynamic modeling of aztreonam-avibactam combination to understand its antimicrobial activity against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Soumis à Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

Liste des communications

Chauzy A., Grégoire N., Lamarche I., Gobin P., Couet W., Marchand S. (2017) Microdialysis study distribution of aztreonam and avibactam in skeletal muscle and intraperitoneal fluid of rats with or without experimental peritonitis. Poster presented at the 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Vienna, Austria (poster P2645).

Chauzy A., Buyck J., Marquizeau E., de Jonge BLM., Marchand S., Couet W., Grégoire N. (2017). A new modeling approach to characterize the pharmacodynamics of aztreonam-avibactam combinations against multidrug resistant organisms determined by checkerboard assays. Oral communication at the annual meeting of the International Society of Anti-Infective Pharmacology in Vienna, Austria.

Chauzy A., Gaelzer Silva Torres B., Buyck J., Marquizeau E., Gobin P., de Jonge BLM., Marchand S., Couet W., Grégoire N. (2018) Semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamics modeling of aztreonam-avibactam combination against multidrug resistant Gram(-) organisms. Poster presented at the 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Madrid, Spain (poster P2421).

Liste des abréviations

AMM : autorisation de mise sur le marché

ATM : Aztréonam

AVI : Avibactam

BLSE : β -lactamase à spectre étendu

CMI : concentration minimale inhibitrice

CMY : céphamycines

COMBACTE-CARE : Combatting Bacterial Resistance in Europe – carbapenem resistance

CTX-M : cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase

DBO : diazabicyclooctane

EARS-Net : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network - Réseau européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens

ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control – Centre européen de prévention et de contrôle des maladies

EMA : European Medicines Agency

ERC : *Enterobacteriaceae* résistantes aux carbapénèmes

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA : Food and Drug Administration

GES : Guiana extended-spectrum β -lactamase

HF : hollow fibers

IMI : Imipenem-hydrolysing β -lactamase

KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MBL : metallo- β -lactamase

ND4BB : New Drugs for Bad Bugs program – programme « de nouveaux médicaments pour de mauvais microbes »

NDM : New Delhi metallo- β -lactamase

NMC : non-metallo carbapenemase

OMS : organisation mondiale de la santé

OXA : oxacillinase

PD : pharmacodynamie

PK : pharmacocinétique

PLP : protéine de liaison des pénicillines

PTA : probability of target attainment

SHV : sulfhydryl variable

SME : *Serratia marcescens* enzymes

TEM : Temoneira

UFC : unite formant colonie

VIM : Verona integron-encoded metallo- β -lactamase

Liste des figures

Figure 1. Pourcentage (%) des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> résistantes aux carbapénèmes par pays, en 2016.....	14
Figure 2. Action des β -lactamines sur la paroi des bactéries à Gram négatif et leur inactivation par les β -lactamases.	15
Figure 3. Structure tridimensionnelle des β -lactamases..	16
Figure 4. Mécanisme d'hydrolyse des carbapénèmes par les β -lactamases.....	17
Figure 5. Spectre d'activité des β -lactamases.....	20
Figure 6. Prévention de l'hydrolyse des β -lactamines par les inhibiteurs de β -lactamases.....	22
Figure 7. Mécanisme d'inhibition des β -lactamases (E) par les inhibiteurs « suicide » (I).	23
Figure 8. Structure chimique de quelques β -lactamines.	25
Figure 9. Structure chimique de l'avibactam.	27
Figure 10. Interaction de l'AVI avec les β -lactamases de classe A, C (panneau A) et D (panneau B) ...	28
Figure 11. Mécanisme d'inhibition réversible des β -lactamases par l'AVI.....	29
Figure 12. Structure tridimensionnelle d'une carbapénémase de type KPC montrant la position des résidus impliqués dans la résistance à l'association ceftazidime-AVI	34
Figure 13. Structure chimique des inhibiteurs de β -lactamases de la classe des diazabicyclooctanones	35
Figure 14. Mécanisme d'inhibition des sérine- β -lactamases par le vaborbactam, dérivé de l'acide boronique.	39
Figure 15. Mécanisme d'inhibition de la métallo- β -lactamase NDM-1 par l'ebesen.....	43
Figure 16. Spectre d'inhibition des inhibiteurs de β -lactamases.....	44
Figure 17. Relation entre trois indices PK/PD et le nombre de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816 dans les poumons de souris neutropéniques après 24 h de traitement avec la céfotaxime.....	69
Figure 18. Probabilité d'atteindre la cible PD (PTA) du linézolide pour une gamme de CMI et pour 3 différentes cibles (PDT) : $AUC_{0-24}/CMI > 50, 75$ et 100 , montrant une tendance à la diminution de la PTA quand la CMI augmente.....	70
Figure 19. Représentation schématique du modèle d'infection hollow fibers.	73
Figure 20. Modèles d'interaction PK/PD permettant d'évaluer l'effet combiné de deux agents antimicrobiens.	79
Figure 21. Représentation schématique des modèles PK/PD utilisés pour caractériser l'effet antimicrobien des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases.	82

Figure 22. Relation entre les indices $fAUC/CMI$, fC_{max}/CMI et $\% fT > CMI$ de l'ATM en présence d'une perfusion constante de 4 mg/L d'AVI et le nombre de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ARC3802 dans un modèle d'hollow-fibers.....	156
Figure 23. Relation entre le $\% fT > C_T$ de l'AVI en présence d'une dose fixe d'ATM et le nombre de différentes souches dans un modèle d'hollow-fibers	157
Figure 24. Pourcentage de temps pendant lequel les concentrations libres d'ATM sont supérieures à la CMI ($\% fT > CMI$) en fonction de différentes valeurs de CMI, chez des volontaires sains recevant 2 g d'ATM toutes les 8 h.	159
Figure 25. Différents profils de concentrations en fonction du temps. (A) Concentrations d'imipénème résultant de l'administration d'une dose clinique de 500 mg toutes les 6 h. (B) Profil de CMI instantanée (MIC_i) résultant des concentrations fluctuantes du rélébactam. (C) Concentrations d'imipénème superposées aux valeurs de MIC_i	160

Liste des tableaux

Tableau 1. Activité inhibitrice de l'AVI contre diverses β -lactamases.....	30
Tableau 2. Comparaison de l'activité inhibitrice de l'AVI et du nacubactam contre diverses β -lactamases.....	37
Tableau 3. Concentrations d'AVI produisant 50% (IC_{50}) et 90% (IC_{90}) de son effet maximum sur la CMI de l'ATM chez 11 souches d' <i>Enterobacteriaceae</i> multi-résistantes.	163

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques a constitué un progrès majeur dans la médecine au cours du 20^{ème} siècle en faisant considérablement reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses. Les β -lactamines font partie des premiers antibiotiques découverts et constituent la classe la plus importante pour le traitement de diverses infections depuis plus de 70 ans (1). Cependant, l'efficacité remarquable de ces antibiotiques s'est accompagnée de leur utilisation massive et répétée en santé humaine et animale. Ce phénomène a généré une pression de sélection entraînant l'émergence et la dissémination des résistances bactériennes. La mauvaise utilisation des antibiotiques, passant par des traitements trop courts ou trop longs, parfois mal dosés, est également pointée du doigt. Ponctuelles au départ, ces résistances sont devenues massives et préoccupantes, les antibiotiques devenant alors moins efficaces voire inefficaces. La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui un problème de santé publique mondial qui touche 500 000 personnes présentant des infections bactériennes présumées dans 22 pays (2). Outre l'augmentation globale de la résistance, la diminution de la découverte de nouvelles molécules antibiotiques depuis deux décennies ne fait qu'aggraver la situation. La crainte principale est l'arrivée d'une nouvelle ère dans laquelle l'arsenal thérapeutique contre les infections deviendrait très limité, voire inexistant.

En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié une liste d'« agents pathogènes prioritaires » résistants aux antibiotiques, énumérant les 12 familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine (3). Les bactéries à Gram négatif multi-résistantes, telles que les *Enterobacteriaceae*, font partie du groupe le plus critique pour lequel le besoin de nouveaux antibiotiques est urgent. La production de β -lactamases représente le principal mécanisme de résistance chez les pathogènes à Gram négatif (1). Pour cette raison et en l'absence de nouveau traitement disponible, deux stratégies ont été employées pour préserver l'utilité des antibiotiques de la classe des β -lactamines : l'optimisation des antibiotiques stables vis-à-vis des β -lactamases et le développement d'inhibiteurs de β -lactamases protégeant les β -lactamines co-administrées (4). Depuis la découverte du premier inhibiteur de β -lactamases dans les années 1970, l'acide clavulanique, et le développement avec succès de la première association β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases (amoxicilline-acide clavulanique), d'autres associations avec des inhibiteurs synthétiques comme le tazobactam et le sulbactam ont vu le jour (4). Cependant, l'évolution rapide des β -lactamases avec des

variants toujours plus nombreux et aux propriétés diverses, comprenant la capacité à hydrolyser des β -lactamines à large spectre comme les carbapénèmes et à être résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases disponibles, a contribué au développement de nouvelles associations avec des inhibiteurs plus puissants. Ce projet de thèse s'intéresse plus particulièrement à l'une d'entre elles : l'association aztréonam-avibactam (ATM-AVI).

L'optimisation de l'usage de ces nouvelles associations, afin d'augmenter leur efficacité antibactérienne tout en prévenant l'émergence de résistance, nécessite la caractérisation de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie de chaque molécule mais aussi de l'interaction pharmacodynamique entre elles. Cette thèse s'inscrit dans ce contexte.

1. *ENTEROBACTERIACEAE* RESISTANTES AUX CARBAPENEMES

1.1. Epidémiologie

Les *Enterobacteriaceae* sont des bacilles à Gram négatif qui font partie de la flore gastro-intestinale commensale et peuvent être la source de nombreuses infections chez l'Homme (5). *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) sont des espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* fréquemment mises en cause et responsables à la fois d'infections communautaires sévères et d'infections nosocomiales, telles que des infections des voies urinaires, des infections des voies respiratoires, des infections intra-abdominales et des septicémies (6, 7). Or, depuis les années 1980, la prise en charge des infections dues aux *Enterobacteriaceae* s'est compliquée par l'émergence de résistances aux antibiotiques qui jusque-là étaient efficaces, comme les fluoroquinolones ou les céphalosporines de 3^{ème} génération (8-10), laissant ainsi comme seule possibilité de traitement les antibiotiques de la classe des carbapénèmes (imipénème, ertapénème, méropénème et doripénème).

Le réseau européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (EARS-Net) met en évidence une situation particulièrement préoccupante, notamment pour *E. coli* et *K. pneumoniae*, pour lesquelles les pourcentages de résistance combinée à différents groupes d'antibiotiques (céphalosporines de 3^{ème} génération, fluoroquinolones et aminoglycosides), signalés dans de nombreuses régions d'Europe sont élevés et, dans de nombreux cas, en augmentation depuis 2013 (11). De plus, l'émergence de résistance aux carbapénèmes ces 10 dernières années est plutôt inquiétante (7, 12, 13), puisque ces antibiotiques à large spectre de la famille des β -lactamines sont souvent les molécules de dernier recours pour le traitement des infections causées par des bactéries multi-résistantes. Les *Enterobacteriaceae* résistantes aux carbapénèmes (ERC) sont désignées par le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) comme des « bactéries cauchemardesques » (https://www.cdc.gov/media/releases/2013/p0305_deadly_bacteria.html) en raison notamment de la fréquence avec laquelle ces pathogènes provoquent des infections (14) et du fort taux de mortalité ($\approx 40\%$) associé aux infections causées par des ERC (15, 16). Toutefois, selon le rapport d'EARS-Net de 2016 (11), la résistance des *Enterobacteriaceae* aux carbapénèmes reste faible en Europe ($< 1\%$) même si elle est

maintenant supérieure à 10% chez *K. pneumoniae* dans quelques pays du sud-est de l'Europe, et à 30% dans 3 d'entre eux dont la Grèce (67%) et l'Italie (34%) (**Figure 1**). Ainsi, la prévalence varie d'un pays à l'autre avec généralement des pourcentages de résistance plus élevés dans le sud et le sud-est de l'Europe que dans le nord.

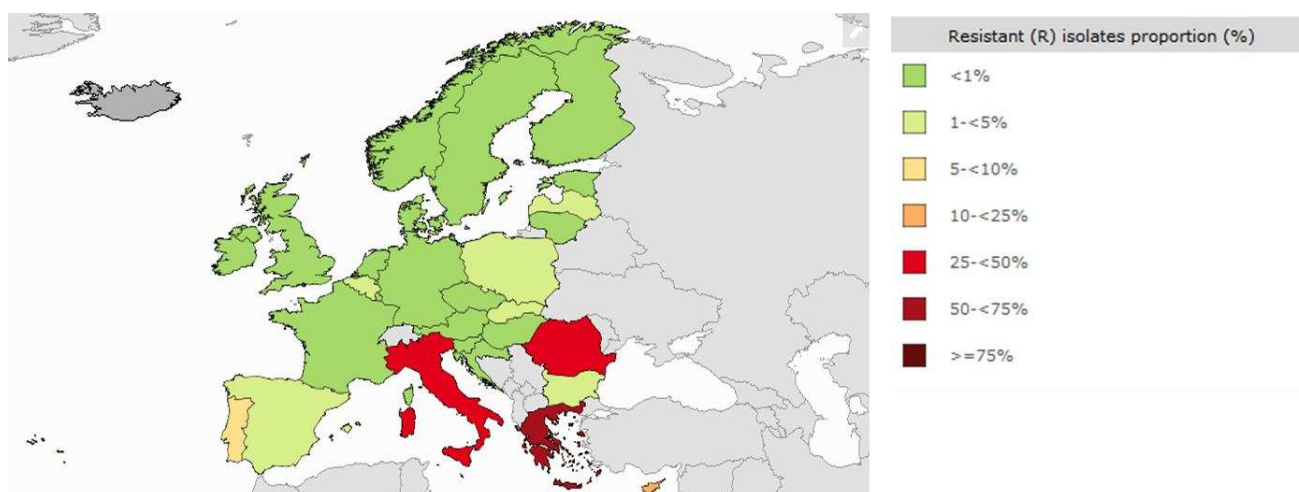


Figure 1. Pourcentage (%) des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes par pays, en 2016 (Données fournies par l'ECDC sur la base des données fournies par l'OMS et les Ministères de la Santé des pays touchés) (17).

1.2. Mécanismes de résistance des ERC

Les carbapénèmes, et plus généralement les β -lactamines, agissent par inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne. Le cycle β -lactame de ces antibiotiques entre en compétition avec le substrat naturel d'enzymes appelées protéines de liaison des pénicillines (PLP) qui catalysent des réactions de transglycosylation et de transpeptidation assurant la formation du peptidoglycane (**Figure 2**) (18). L'inhibition de la synthèse des peptidoglycanes conduit alors à un affaiblissement de la paroi cellulaire, souvent suivi par la lyse et la mort cellulaire.

La résistance aux carbapénèmes chez les *Enterobacteriaceae* résulte essentiellement de deux mécanismes qui seront présentés en détail aux sections 1.2.2 et 1.2.3 et qui impliquent tous deux des β -lactamases (7, 19). Ces enzymes inactivatrices de masse

moléculaire comprise entre 20 et 40 kDa (20) se trouvent dans l'espace périplasmique des bactéries à Gram négatif et hydrolysent la liaison amide au niveau du cycle β -lactame commun à tous les antibiotiques de la famille des β -lactamines (21) (**Figure 2** et **Figure 4**).

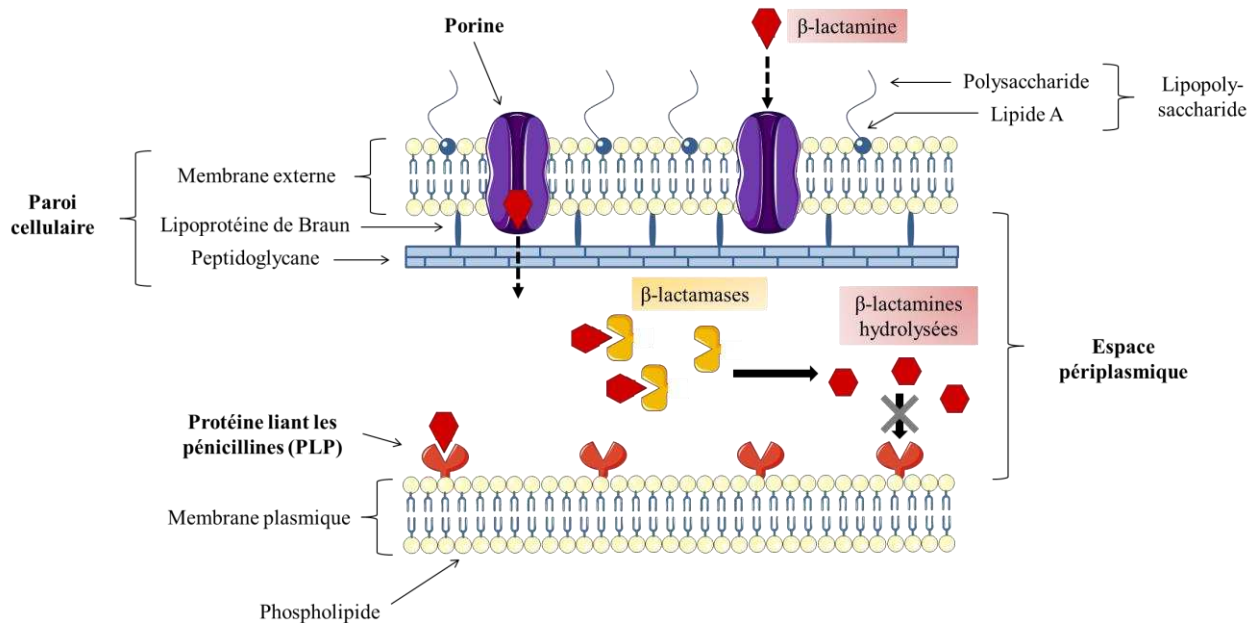


Figure 2. Action des β -lactamines sur la paroi des bactéries à Gram négatif et leur inactivation par les β -lactamases.

1.2.1. Classification des β -lactamases

Au vu du nombre élevé de β -lactamases et de la diversité de ces enzymes, plusieurs classifications ont été proposées. La classification de Bush et Jacoby se compose de 4 groupes basés sur les caractéristiques fonctionnelles des β -lactamases (profil de substrats et profil d'inhibition) (22, 23) tandis que la classification proposée par Ambler en 1980 (24) puis réactualisée en 2005 (25) divise les β -lactamases en 4 classes (A, B, C et D) selon la séquence en acides aminés de leur site actif (**Figure 3**).

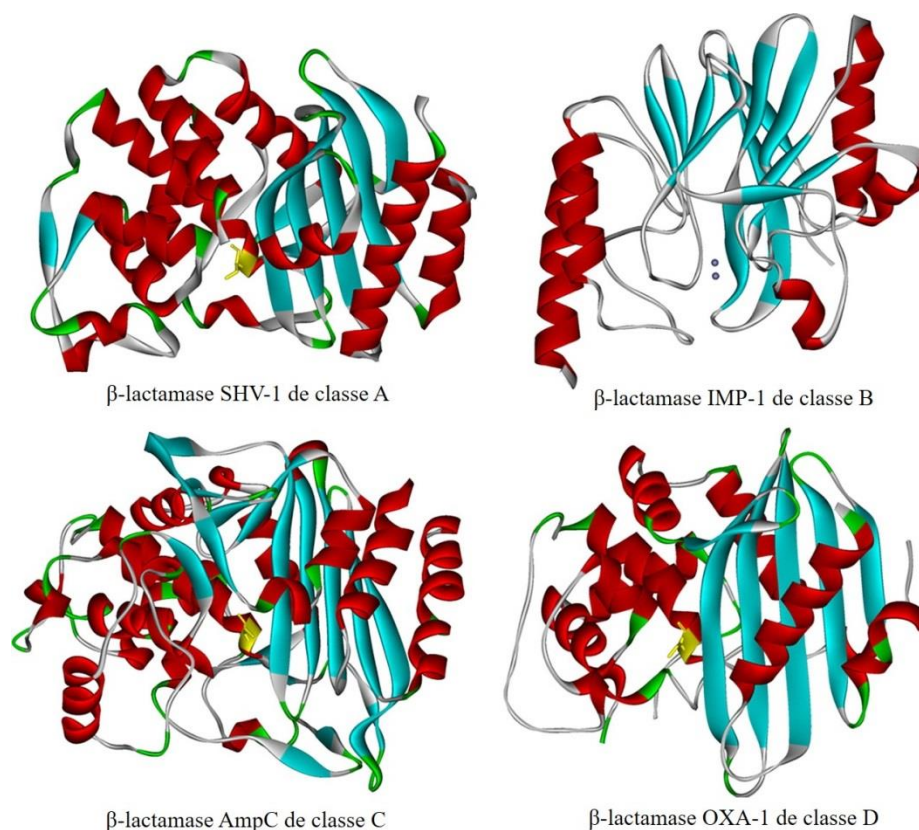


Figure 3. Structure tridimensionnelle des β-lactamases. Pour les β-lactamases de classe A, C et D, le résidu sérine du site actif est représenté en jaune ; pour la β-lactamase de classe B, les deux ions Zn^{2+} du site actif sont représentés par deux sphères bleues (d'après Drawz SM, 2010 (4)).

Pour les besoins du mémoire, c'est la classification d'Ambler qui sera considérée. Elle distingue :

- Les β-lactamases à sérine active : pénicillinasés (classe A), céphalosporinasés (classe C) et oxacillinasés (classe D). Un intermédiaire acyl-enzyme instable est formé, au cours de leur activité enzymatique, avant d'être dégradé en un acide inactif (**Figure 4**).
- Les metallo-β-lactamases (classe B) qui nécessitent un ion métallique bivalent, généralement le zinc, pour leur activité. Ces enzymes hydrolysent directement le cycle β-lactame sans création d'intermédiaire (**Figure 4**).

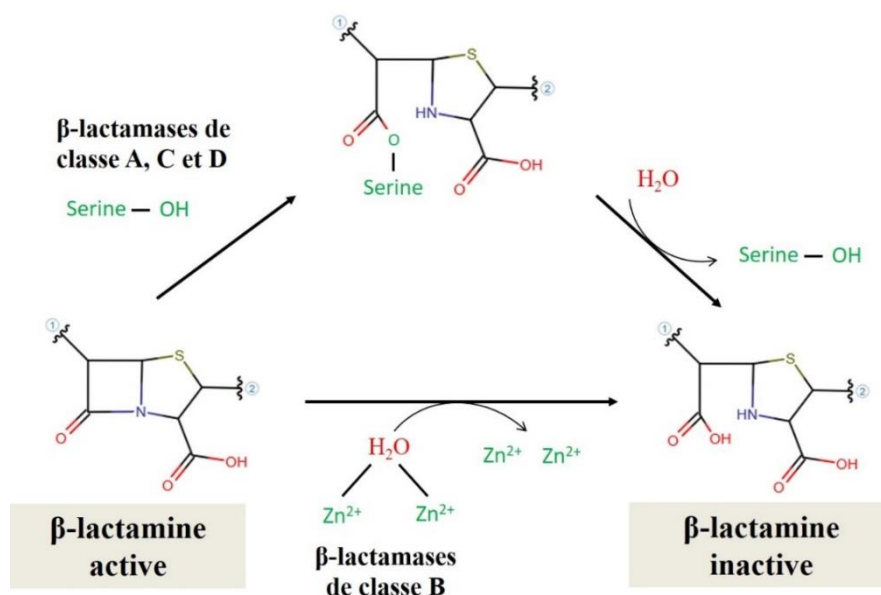


Figure 4. Mécanisme d'hydrolyse des carbapénèmes par les β -lactamases.

1.2.2. Imperméabilité membranaire et expression de β -lactamases

Le premier mécanisme de résistance aux carbapénèmes associe la production de β -lactamases possédant une faible activité hydrolytique envers les carbapénèmes à une diminution de la perméabilité de la membrane externe, soit par diminution de l'influx (diminution de l'expression des porines au niveau de la membrane externe) soit par augmentation de l'efflux (activation de pompes d'efflux) (7, 14, 19). Ce mécanisme a été décrit chez différentes espèces d'*Enterobacteriaceae* produisant naturellement des céphalosporinases codées par des gènes chromosomiques (*Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp.) (19), mais aussi chez des espèces qui expriment des céphalosporinases plasmidiques comme CMY-2 résistante aux céphamycines (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*) (20). De la même manière, la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSEs) de classe A, de types TEM (Temoneira), SHV (*sulphydryl variable*), CTX-M (BLSE capable d'hydrolyser la céfotaxime), en association avec une diminution de la perméabilité de la membrane externe chez certaines *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp.) peut être responsable de résistance aux carbapénèmes (26). Cependant, ce mécanisme de résistance semblerait instable et plusieurs études ont montré qu'il concernerait plus l'ertapénème que l'imipénème et le méropénème (19, 26).

1.2.3. Production de carbapénémases

Le second mécanisme de résistance développé par les *Enterobacteriaceae* est lié à l'expression de β -lactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, les carbapénémases. Il est plus important d'un point de vue clinique car il compromet le plus souvent l'efficacité de presque toutes les β -lactamines. Les carbapénémases appartiennent aux classes A, B et D d'Ambler (7, 27).

Les carbapénémases appartenant à la classe A sont de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), IMI (imipenemase), SME (*Serratia marcescens*), NMC (non-métallo carbapenemase), GES (Guiana extended-spectrum β -lactamase), etc. Les enzymes de type KPC sont les carbapénémases de classe A les plus fréquentes et les plus menaçantes (27, 28). Le premier variant de cette famille a été identifié dans une souche de *K. pneumoniae* en 1996, en Caroline du Nord aux Etats-Unis (28) puis s'est largement répandu à travers le monde. Les bactéries productrices de KPC sont considérées comme endémiques dans certaines parties du monde, telles que le nord-est des États-Unis, la Colombie, la Grèce, l'Italie, Israël et la Chine (7). Ces bactéries sont résistantes à toutes les β -lactamines mais aussi à la plupart des autres familles d'antibiotiques puisque les plasmides codant pour KPC contiennent souvent plusieurs gènes de résistance à d'autres agents antimicrobiens comme les aminoglycosides, les quinolones et les tétracyclines (7), ce qui explique le fort taux de mortalité associé aux infections causées par les bactéries productrices d'enzymes de type KPC (28). Ces enzymes ont toutefois la particularité de voir leur activité *in vitro* inhibée par des inhibiteurs de β -lactamases, comme l'acide clavulanique et le tazobactam (27).

Les carbapénémases de classe B, retrouvées chez les *Enterobacteriaceae*, correspondent majoritairement aux métallo- β -lactamases (MBLs) de type IMP (MBL initialement trouvée chez des souches résistantes à l'imipénème) et VIM (Verona integron-mediated MBL) (14). Initialement observées au Japon et en Italie dans *S. marcescens* et *P. aeruginosa* respectivement, les enzymes de type IMP et VIM ont par la suite été isolées dans des *Enterobacteriaceae* dans le monde entier (7, 29). En 2008 une nouvelle MBL, la New Delhi MBL (NDM), a été décrite dans une souche de *K. pneumoniae* chez un patient suédois ayant reçu des soins médicaux en Inde (29). Bien que les réservoirs principaux des

Enterobacteriaceae productrices de NDM soient localisés dans le sous-continent indien, ces souches ont été observées sur tous les continents et constituent une réelle menace sanitaire mondiale en raison, notamment, de leur importante propagation dans la communauté (27). De plus, les MBLs ont la capacité d'hydrolyser toutes les β -lactamines à l'exception des monobactames. Leur activité *in vitro* n'est pas affectée par les inhibiteurs de β -lactamases.

Enfin, les carbapénémases de classe D correspondent essentiellement aux enzymes de type oxacillinases (OXA-48, OXA-163, OXA-181) (7). À l'exception d'OXA-48 et ses variants, les oxacillinases sont principalement retrouvées chez *A. baumannii* (30). La première souche de *K. pneumoniae* productrice d'OXA-48 a été isolée en Turquie en 2003 (31). Depuis, les bactéries productrices d'oxacillinases ont très largement diffusé en Europe, en Afrique et dans le sous-continent indien (32). OXA-48 est principalement retrouvée chez *K. pneumoniae* et *E. coli*, même si d'autres espèces d'*Enterobacteriaceae* peuvent produire ce type d'enzyme. Ces enzymes ont une plus faible activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes que les autres carbapénémases et sont peu actives contre les céphalosporines de 3^{ème} génération. Elles sont toutefois résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases.

La **Figure 5** récapitule le spectre d'activité des différentes classes de β -lactamases vis-à-vis des β -lactamines.

β-lactamines				
Pénicillines amoxicilline, ampicilline, oxacilline...	Céphalosporines de 1 ^{ère} et 2 ^{ème} génération céfалотine, céfuroxime, céfoxitine...	Céphalosporines de 3 ^{ème} , 4 ^{ème} et 5 ^{ème} génération céfотaxime, ceftazidime, céfépime, ceftaroline...	Monobactames aztreonam	Carbapénèmes imipénème, méroпénème, ertapénème...

β-lactamases

Classe A	<u>pénicillinases</u>	
	<u>BLSEs (TEM, SHV, CTX-M...)</u>	
	<u>carbapénémases (KPC, IMI, GES...)</u>	
Classe B	<u>métallo-β-lactamases (IMP, VIM, NDM...)</u>	
Classe C	<u>céphalosporinases (AmpC...)</u>	
Classe D	<u>Oxacillinases (OXA-1, OXA-10...)</u>	
	<u>BLSEs (OXA-11, OXA-15...)</u>	
	<u>carbapénémases (OXA-48, OXA-23...)</u>	

Figure 5. Spectre d'activité des β-lactamases. Les lignes horizontales représentent le profil d'hydrolyse de chaque classe de β-lactamases par rapport aux différentes familles de β-lactamines (d'après Nordmann P, 2014 (27)).

Les ERC sont donc généralement résistantes à toutes les β-lactamines disponibles sur le marché, y compris les carbapénèmes, les pénicillines, les céphalosporines et les associations avec les inhibiteurs de β-lactamases. Une seule exception existe : les *Enterobacteriaceae* qui produisent des MBLs sont sensibles aux monobactames. Cependant, la majorité des souches produisant des MBLs expriment également d'autres β-lactamases dont d'autres types de carbapénémases et des BLSEs capables d'hydrolyser les monobactames (7, 33). Une étude a montré, par exemple, que sur 37 souches isolées au Royaume-Uni et produisant des MBLs de type NDM-1, 33 étaient résistantes à toutes les β-lactamines, y compris l'aztréonam (ATM) qui fait partie de la famille des monobactames, de par l'expression concomitante d'autres β-lactamases de types BLSEs ou cephalosporinases (33). Les gènes de ces enzymes sont, le plus souvent, plasmidiques et associés au sein d'intégrons et de transposons, structures qui assurent la mobilité et la diffusion inter-espèces de ces gènes

de résistance. L'association des gènes de carbapénémases à d'autres gènes de résistance aux antibiotiques sur de mêmes structures génétiques explique en grande partie la multi-résistance de ces souches (34).

2. LUTTE CONTRE LES ERC

2.1. Traitements antibiotiques disponibles

Les infections dues à des souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases atteignent souvent des taux de mortalité supérieurs à 50%, en raison principalement de l'absence d'agents antimicrobiens efficaces (35). Très peu d'options thérapeutiques sont disponibles en cas d'infection causée par des bactéries multi-résistantes. Les antibiotiques de dernier recours actifs contre les ERC se limitent aux polymyxines (colistine et polymyxine B), quelques aminoglycosides, la tigécycline et la fosfomycine (12). Cependant l'administration de ces molécules est souvent associée à de nombreux effets indésirables (36, 37) et au développement de résistances (38-41) qui limitent leur utilisation en monothérapie. En revanche, l'association de plusieurs antibiotiques, comprenant notamment un carbapénème et un second agent comme la colistine, la tigécycline ou la gentamicine, serait efficace pour traiter les infections sévères à ERC (42-45). En effet, l'utilisation de thérapie combinée permettrait ainsi d'étendre le spectre d'activité antimicrobien, de diminuer la toxicité, de prévenir l'émergence de résistance et d'obtenir un effet antimicrobien synergique (46). Cependant ces observations faites à partir d'études le plus souvent non randomisées et incluant peu de patients restent à confirmer (47).

2.2. Associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases

Le développement de nouveaux médicaments étant un processus long, complexe et coûteux, une alternative pour lutter contre les *Enterobacteriaceae* productrices de carbapénémases consiste à restituer l'efficacité des antibiotiques disponibles devenus inefficaces en associant les β -lactamines à des molécules capables d'inhiber les β -lactamases.

Il s'agit généralement de petites molécules hydrophiles de masse moléculaire inférieure à 300 daltons diffusant très facilement vers le périplasme en utilisant la voie des porines (48) (**Figure 6**).

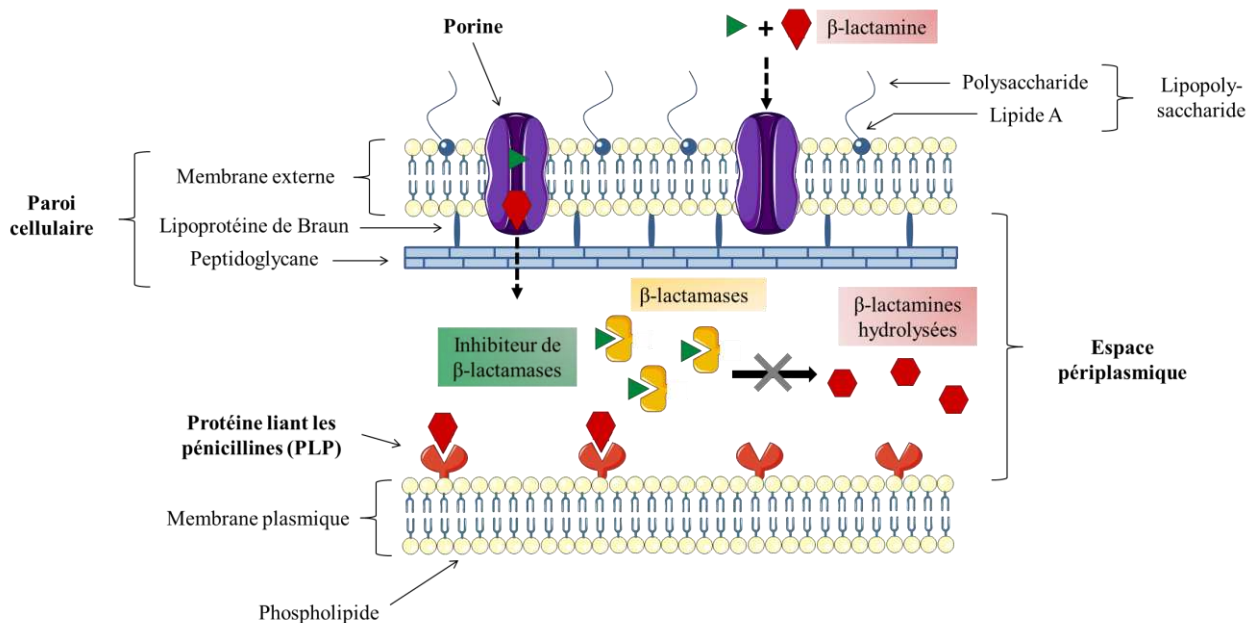


Figure 6. Prévention de l'hydrolyse des β-lactamines par les inhibiteurs de β-lactamases.

2.2.1. Inhibiteurs de β-lactamases classiques

Les premiers inhibiteurs de β-lactamases ont été développés dans les années 1970-1980 et incluaient l'**acide clavulanique**, le **sulbactam** et le **tazobactam** (4). Ces inhibiteurs « suicide » présentent une structure similaire aux pénicillines mais ont une faible activité bactéricide, seuls. Administrés en association avec les β-lactamines, ils forment une liaison covalente avec les β-lactamases, protégeant ainsi l'antibiotique de la dégradation par ces enzymes et élargissant son spectre d'activité. L'inhibiteur et la β-lactamase forment un premier complexe non-covalent qui est ensuite converti en un intermédiaire plus stable de type acyl-enzyme (4). Selon les propriétés de la β-lactamase et de l'inhibiteur, l'intermédiaire acyl-enzyme peut subir une réaction chimique réversible générant une enzyme inhibée de façon transitoire, conduire à une inactivation permanente de l'enzyme via la formation d'une liaison covalente ou régénérer l'enzyme active via l'hydrolyse de l'inhibiteur acylé (**Figure 7**).

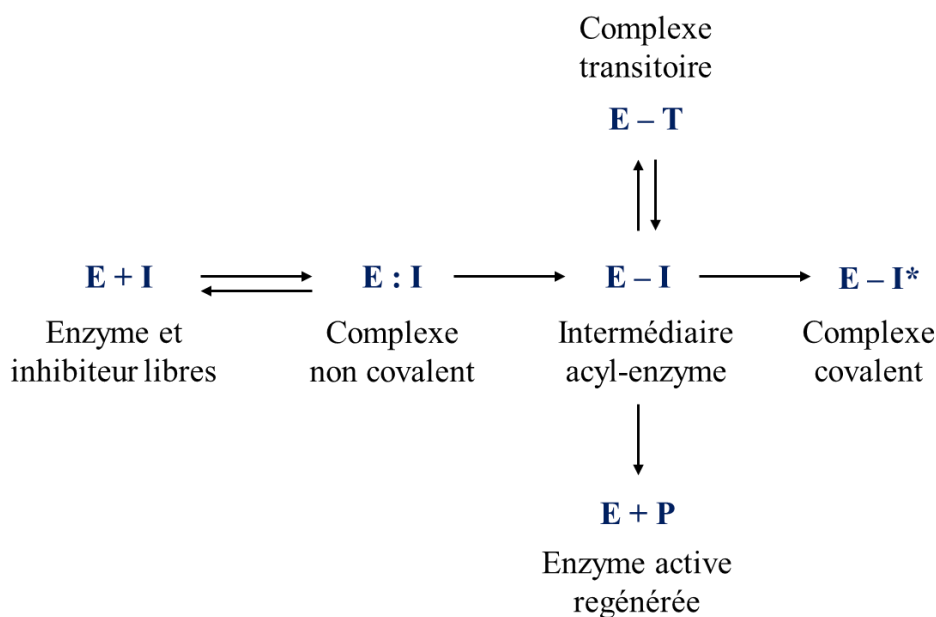


Figure 7. Mécanisme d'inhibition des β -lactamases (E) par les inhibiteurs « suicide » (I).

Quatre associations de β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases ont été largement utilisées avec succès en clinique : amoxicilline-acide clavulanique, ticarcilline-acide clavulanique, ampicilline-sulbactam, et piperacilline-tazobactam. Ces quatre associations sont généralement efficaces contre les bactéries productrices de β -lactamases de classe A mais sont beaucoup moins actives sur les enzymes de classe B, C et D, et inactives contre les carbapénémases, limitant leur intérêt clinique dans certaines infections (49). De plus, peu après leur arrivée sur le marché, des isolats cliniques résistants à ces associations β -lactamine-inhibiteur ont émergé. Ces souches ont soit acquis une β -lactamase naturellement peu sensible aux inhibiteurs ou soit accumulé des mutations dans les gènes codant pour les β -lactamases, conduisant à des variants résistants aux inhibiteurs (50). Ce deuxième mécanisme de résistance a bien été décrit chez des souches productrices d'enzymes de type TEM et SHV qui sont habituellement sensibles aux associations β -lactamine-inhibiteur mais, chez qui, des substitutions dans la séquence en acides aminés de ces β -lactamases ont modifié les propriétés des enzymes et entraîné une résistance à ces combinaisons (51, 52). L'émergence de résistance aux associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases actuellement disponibles remet donc en question la capacité à traiter avec succès les infections graves des voies urinaires, des voies respiratoires et les septicémies (4).

Face à cette menace, des efforts pour le développement de nouvelles molécules efficaces pour lutter contre ces pathogènes multi-résistants produisant un nombre toujours croissant de β -lactamases diverses ont dû être faits. En ce sens, une nouvelle céphalosporine de 3^{ème} génération, le ceftolozane, a été développé en combinaison avec le tazobactam. Cette nouvelle association, nommée Zerbaxa[®], a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2015 dans le traitement, chez l'adulte, des infections intra-abdominales et urinaires compliquées, et des pyélonéphrites aiguës. L'efficacité et la tolérance de Zerbaxa[®] ont été étudiées dans 2 études de phase III de non infériorité, randomisées en double aveugle, l'une réalisée dans les infections urinaires compliquées (y compris les pyélonéphrites) (53), l'autre dans les infections abdominales compliquées (54). Le ceftolozane a une activité puissante contre les bactéries à Gram négatif (55). Il s'est montré 8 à 16 fois plus puissant que les autres céphalosporines contre diverses souches de *P. aeruginosa*, y compris des souches multi-résistantes, en raison notamment d'une plus forte affinité pour les PLP1b, 1c, 2 et 3 que la ceftazidime (55-57). De plus, le ceftolozane est moins sensible à l'hydrolyse par les β -lactamases AmpC et est un faible substrat des pompes d'efflux (56, 57). Cet antibiotique est également actif contre les *Enterobacteriaceae* y compris certaines souches produisant des BLSEs. Une étude *in vitro* réalisée sur 59 souches d'*Enterobacteriaceae* productrices de BLSEs a montré que 20% d'entre elles étaient sensibles au ceftolozane à une concentration de 8 mg/L et que la présence de 4 mg/L et 8 mg/L de tazobactam permettait de restaurer la sensibilité de 76% et 93% des souches, respectivement (58). Cependant la plupart des souches productrices de carbapénémases restent résistantes à l'association ceftolozane-tazobactam.

Par ailleurs, un nouvel inhibiteur de β -lactamases, **AAI101**, analogue au tazobactam mais plus puissant et ayant une activité sur certaines carbapénémases de type KPC, est en cours de développement en association avec la céfépime (59, 60).

2.2.2. Association aztréonam-avibactam : Projet Combacte-Care

La Commission européenne a adopté en 2011 un plan d'action pour combattre les menaces croissantes de la résistance aux antibiotiques. Celui-ci a notamment permis d'accroître la surveillance des résistances au sein de l'Union européenne et de mettre en place en 2012 un vaste programme intitulé *New Drugs for Bad Bugs* (ND4BB), littéralement « de

nouveaux médicaments pour de mauvais microbes ». Son objectif est de soutenir les projets collaboratifs privés-publics européens pour relever les défis de l'antibiorésistance, notamment la découverte et le développement de nouveaux traitements. C'est dans ce cadre qu'a vu le jour le projet COMBACTE-CARE (pour *Combating Bacterial Resistance in Europe – carbapenem resistance*), qui vise à générer des essais cliniques innovants en ciblant de nouvelles molécules, comme l'association aztréonam-avibactam (ATM-AVI), contre les infections sévères à *Enterobacteriaceae* multi-résistantes.

2.2.2.1. Aztréonam

L'aztréonam (ATM) est un antibiotique de la famille des β -lactamines et le seul membre de la classe des monobactames utilisé en clinique (61). Avec son noyau monocyclique, il se différencie structurellement des autres β -lactamines (**Figure 8**).

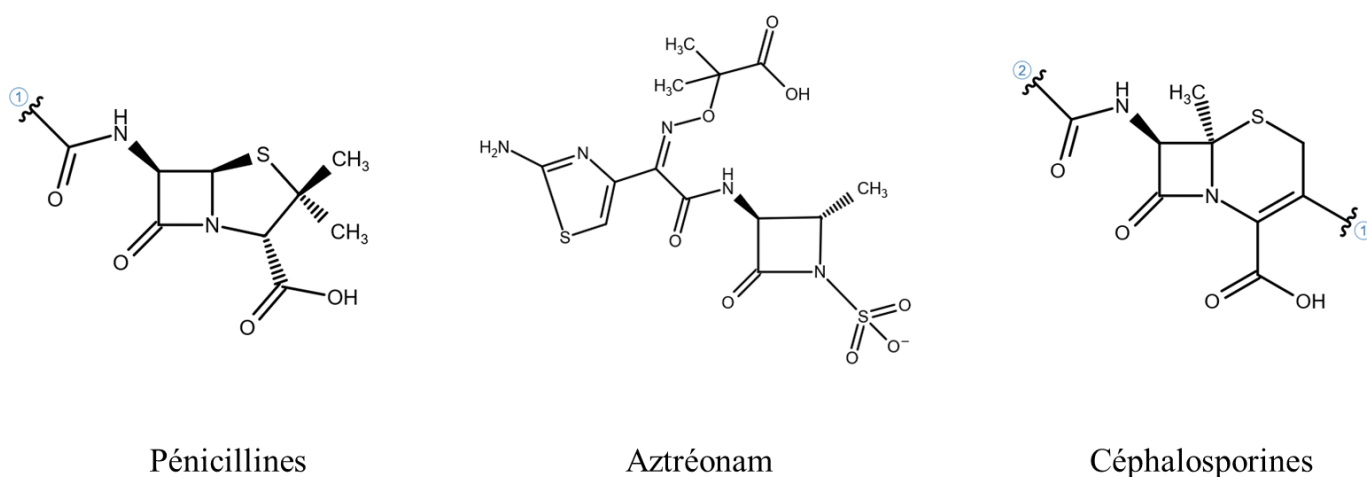


Figure 8. Structure chimique de quelques β -lactamines.

Mécanisme d'action

L'activité antimicrobienne de l'ATM est due à sa liaison, avec une forte affinité, aux PLP3, transpeptidases essentielles à la formation du peptidoglycane bactérien, inhibant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire et conduisant par la suite à la mort cellulaire (62).

Spectre antibactérien

L'ATM possède un spectre d'activité étroit limité aux bactéries à Gram négatif aérobies telles que les *Enterobacteriaceae* et *P. aeruginosa* (63, 64). Des concentrations d'ATM inférieures à 1 µg/mL inhibent la plupart des souches *Enterobacteriaceae*. L'activité de l'ATM est, cependant, moins importante vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* et d'*Acinetobacter* avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) reportées supérieures à 4 µg/mL (65, 66).

Sensibilité à l'hydrolyse par les β -lactamases

L'ATM n'induit pas la production de β -lactamases et est généralement un faible inducteur des β -lactamases à médiation chromosomique (65). Du fait de sa structure chimique unique, l'ATM est le seul antibiotique de la famille des β -lactamines à ne pas être hydrolysé efficacement par les MBLs (67). Cependant les résultats d'une étude récente remettent en question cette idée largement répandue selon laquelle les MBLs ne seraient pas actives sur l'ATM et démontrent que les MBLs de type NDM-1 pourraient hydrolyser l'ATM (68). Par conséquent, le potentiel de résistance des souches via la production de MBLs doit être pris en compte dans l'évaluation de l'utilisation clinique de l'ATM, individuellement ou en association. En revanche, l'ATM est inactif contre les souches produisant des BLSEs, des carbapénémases de type KPC ou des cephalosporinases AmpC codées par des gènes plasmidiques ou chromosomiques. Donc, bien que l'ATM soit actif contre de nombreuses bactéries à Gram négatif produisant seulement des MBLs, il est souvent hydrolysé par d'autres β -lactamases que coexpriment les pathogènes.

Indications thérapeutiques

L'ATM (Azactam®) a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1986 et constitue une alternative aux aminoglycosides plus toxiques (65). Il est indiqué chez l'adulte dans le traitement par voie systémique des infections des voies urinaires hautes et basses compliquées ou non ainsi que des infections sévères à bactéries à Gram négatif sensibles (exceptées les méningites) comme les infections broncho-pulmonaires, les septicémies, les infections de la peau et des parties molles, les infections intra-abdominales et les infections gynéco-obstétricales (https://packageinserts.bms.com/pi/pi_azactam.pdf). En

cas d'infection polymicrobienne ou tant que l'organisme responsable de l'infection n'a pas été identifié, l'utilisation d'un autre agent antibiotique de manière concomitante est souvent d'usage afin de couvrir les bactéries à Gram positif et les espèces anaérobiques. L'ATM a par exemple été associé avec succès à la clindamycine (69) pour le traitement d'infections intra-abdominales ainsi que dans le cas d'infections sévères chez des patients neutropéniques (70). En revanche, son association avec certains antibiotiques comme le linézolide est à éviter, ces deux molécules étant considérées comme antagonistes puisqu'en inhibant la synthèse protéique, le linézolide s'oppose à l'activité de l'ATM (71). L'ATM existe également sous forme de poudre pour nébuliseur (Cayston[®]) permettant son administration par voie inhalée. Il fait ainsi partie des principaux antibiotiques recommandés dans la prise en charge des infections broncho-pulmonaires à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (72).

2.2.2.2. Avibactam

Mécanisme d'inhibition des β -lactamases

L'avibactam (AVI), anciennement nommé NXL104 ou AVE1330A, est un nouvel inhibiteur de β -lactamases de synthèse, de la classe des diazabicyclooctanes (DBO) (73). Contrairement aux inhibiteurs classiques, l'AVI ne possède pas de cycle β -lactame mais un cycle à 5 chaînons avec un groupe amide qui cible le résidu sérine du site actif des β -lactamases (**Figure 9**) (74).

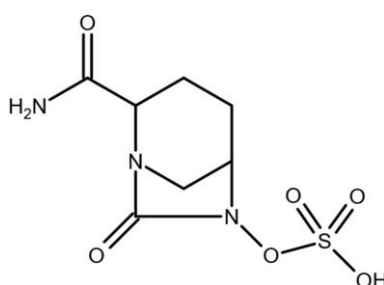


Figure 9. Structure chimique de l'avibactam.

L'inactivation des enzymes par l'AVI se fait en 2 étapes : un premier complexe enzyme-inhibiteur se forme avant la conversion en un complexe plus stable par ouverture du cycle à 5 chaînons de l'AVI et l'établissement d'une liaison carbamate entre le groupement carbonyle de l'AVI et le résidu sérine de la β -lactamase (**Figure 10** et **Figure 11**).

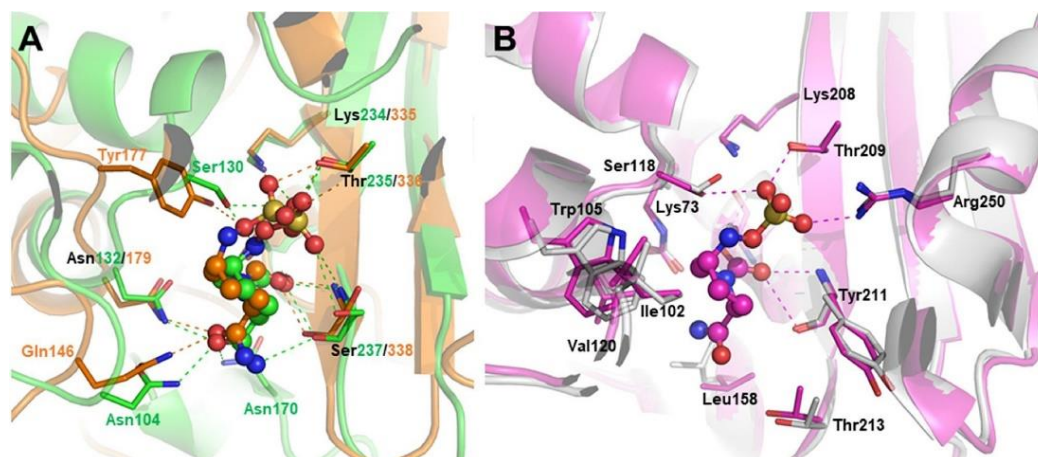


Figure 10. Interaction de l'AVI avec les β -lactamases de classe A, C (panneau A) et D (panneau B).

L'inhibiteur, représenté par des billes et des bâtons, est lié de manière covalente au résidu sérine catalytique de l'enzyme et interagit avec de nombreux résidus fonctionnellement importants. (A) superposition de la β -lactamase à spectre étendu de classe A CTX-M-15 (vert) et de la β -lactamase AmpC de classe C exprimée par *P. aeruginosa* (orange) inhibées par l'AVI. (B) AVI lié à la carbapénémase de classe D OXA-48 (rose) ; la position des résidus du site actif dans l'enzyme native (blanc) est également montrée (d'après Docquier JD, 2018 (75)).

La liaison covalente de l'AVI aux β -lactamases est réversible et, à la différence des inhibiteurs dérivés des β -lactamines, l'AVI n'est pas hydrolysé, une fois lié à l'enzyme. La désacylation du complexe enzyme-inhibiteur régénère une molécule d'AVI intacte, disponible alors pour initier un nouveau cycle d'inhibition (74, 76) (**Figure 11**).

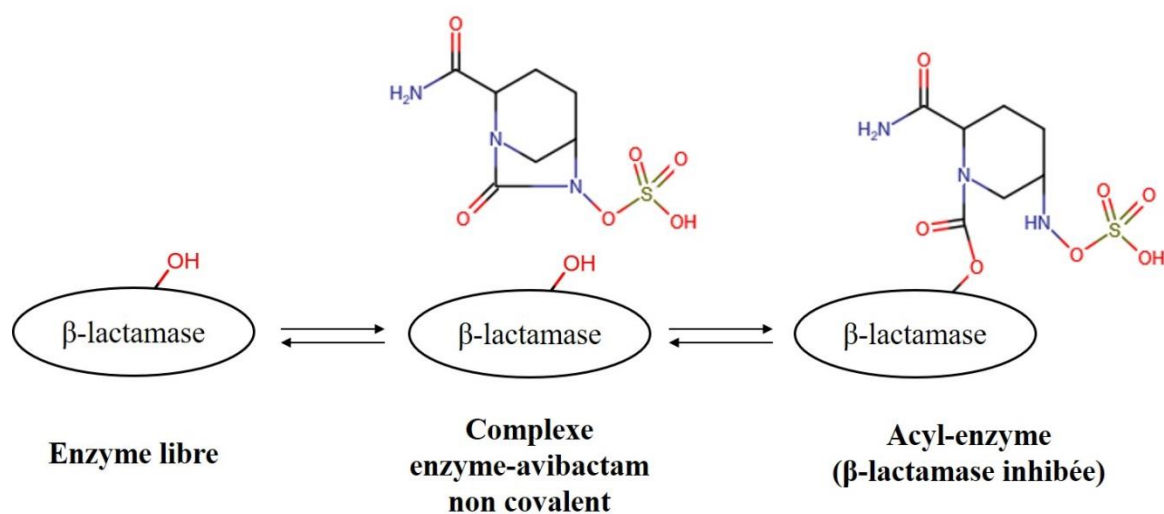


Figure 11. Mécanisme d'inhibition réversible des β-lactamases par l'AVI.

Une exception à ce mécanisme d'inhibition réversible est tout de même à noter, la carbapénémase KPC-2 serait capable d'hydrolyser l'AVI (76). Toutefois, la faible vitesse de désacylation de KPC-2 semblerait avoir peu d'impact sur l'activité des associations β-lactamine-AVI envers les souches productrices de KPC-2.

Spectre d'inhibition

L'activité inhibitrice de l'AVI a été évaluée au cours de plusieurs études *in vitro* par spectrophotométrie en utilisant la nitrocéfine comme substrat des β-lactamases (77-79). Ainsi, après une période de pré-incubation de 5 à 10 minutes de la β-lactamase en présence de différentes concentrations d'inhibiteur, la variation d'absorbance, correspondant à l'ouverture du cycle β-lactame de la nitrocéfine, est mesurée par spectrophotométrie. L'IC₅₀, correspondant à la concentration en AVI nécessaire pour diminuer de 50% la concentration d'enzyme active, est alors déterminée et comparée à l'IC₅₀ des inhibiteurs déjà commercialisés (**Tableau 1**).

Tableau 1. Activité inhibitrice de l'AVI contre diverses β -lactamases

Enzyme	IC ₅₀ (nM)				Références
	AVI	Acide clavulanique	Tazobactam	Sulbactam	
Classe A					
TEM-1	8	58	32	1 560	(78)
TEM-10	13	5	34	136	(79)
CTX-M-14	3	40	3	464	(79)
CTX-M-15	5	12	6	230	(78)
CTX-M-44	4	24	3	181	(79)
SHV-4	3	4	55	260	(78)
KPC-2	170	> 100 000	50 000	57 000	(78)
Classe C					
P99	100	> 100 000	1 300	21 100	(78)
<i>E. cloacae</i> AmpC	923	> 300 000	5 430	32 200	(79)
<i>P. aeruginosa</i> AmpC	128	> 100 000	4 600	27 000	(78)
CMY-2	44	76 100	723	6 550	(79)
Classe D					
OXA-1	130	988	1 400	5 470	(79)
OXA-2	485	230	2.43	66.6	(79)
OXA-23	2 320	6 460	957	20 800	(79)
Classe B					
IMP-1	> 300 000	ND	ND	ND	(79)
ND, non déterminé					

L'AVI inhibe de façon puissante (IC₅₀ < 1 μ M) les BLSES et carbapénémases de classe A, les β -lactamases de classe C et certaines oxacillinasés de classe D. Bien que l'AVI ait une valeur d'IC₅₀ similaire à celle du tazobactam vis-à-vis de certaines BLSEs de type CTX-M et de l'acide clavulanique vis-à-vis de TEM-10 et SHV-4, l'AVI démontre en règle générale une activité inhibitrice supérieure à celle des autres inhibiteurs en ce qui concerne les enzymes de classe A et C, et en particulier envers les carbapénémases de type KPC-2 pour lesquelles une IC₅₀ 300 fois inférieure à celle du tazobactam a été reportée. De plus, de par la grande stabilité des complexes covalents β -lactamase-AVI, des faibles valeurs de *turnover*, correspondant au nombre de molécules inhibitrices requises pour inactiver une seule β -lactamase, ont été déterminées pour l'AVI (80). En effet, seulement 1 à 5 molécules d'AVI sont nécessaires pour inhiber 1 molécule de TEM-1 ou P99, contre plus de 50 pour le tazobactam et l'acide clavulanique (80), ce qui fait de l'AVI un des inhibiteurs de β -lactamases les plus puissants à ce jour. Contre les carbapénémases de classe D telles que OXA-23, l'AVI montre cependant une activité inhibitrice plus faible que contre les enzymes

de classe A et C. Certaines β -lactamases de classe D semblent même plus résistantes à l'inhibition par l'AVI que par les autres inhibiteurs bien que ces résultats doivent être traités avec prudence puisque certaines de ces enzymes peuvent se convertir en formes plus ou moins actives, ce qui peut avoir un impact sur leur sensibilité à l'inhibition (79). En revanche, l'AVI n'inhibe pas les MBLs de classe B (IMP-1) de façon significative, comme indiqué par la valeur élevée d'IC50 supérieure à 300 μ M.

Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne *in vitro* de l'AVI a été évaluée contre diverses souches à Gram positif et à Gram négatif mais, comme les autres inhibiteurs de β -lactamases, l'AVI a très peu d'activité seul (81-83). Une CMI d'AVI comprise entre 8 et 16 μ g/mL a été reportée pour la majorité des souches d'*Enterobacteriaceae* productrices de β -lactamases étudiée. L'analogie structurelle entre les β -lactamases et les PLPs des bactéries suggèrent que l'AVI pourrait interagir avec les PLPs. En effet, une étude évaluant l'affinité de l'AVI pour les PLPs de différentes souches et espèces bactériennes a montré que l'AVI pouvait se lier de façon covalente aux PLP2 d'*E. coli* et *H. influenzae*, aux PLP2 et PLP3 de *P. aeruginosa* et *S. aureus* et aux PLP3 de *S. pneumoniae* (83).

Activité de l'AVI en association avec les β -lactamines

L'activité de l'AVI seul ou en association avec différents antibiotiques, et plus particulièrement avec la **ceftazidime**, la **ceftaroline** et l'**ATM**, a été évaluée lors d'études *in vitro* (63, 84-89) et *in vivo* dans des modèles d'infection murins (90-93).

L'AVI restaure l'activité intrinsèque de la ceftazidime et la ceftaroline contre de nombreux pathogènes, y compris les *Enterobacteriaceae* multi-résistantes qui produisent des β -lactamases de classe A et de classe C (84, 85, 87). Plusieurs études *in vitro* réalisées sur des souches d'*Enterobacteriaceae* produisant des β -lactamases de type BLSE, AmpC ou des carbapénémases de type KPC ont montré qu'une concentration d'AVI inférieure ou égale à 4 mg/L permettait de diminuer la CMI de l'antibiotique à une valeur inférieure au *breakpoint* de sensibilité défini par l'EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), rendant les souches alors à nouveau sensibles (82, 94). De plus, plusieurs études cliniques visant à évaluer l'efficacité et la tolérance de l'association ceftazidime-AVI ont

démonstré que cette association pouvait être une alternative aux carbapénèmes chez les patients atteints d'infections causées par les *Enterobacteriaceae* résistantes à la ceftazidime (95, 96). Cette combinaison a d'ailleurs obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 2014 aux Etats-Unis et en 2016 en Europe dans le traitement des infections intra-abdominales compliquées, des infections urinaires compliquées, des pneumonies nosocomiales et des infections dues à des bactéries aérobies à Gram négatif chez des adultes pour qui les options thérapeutiques sont limitées. L'intérêt potentiel de l'association ceftazidime-AVI réside dans son activité sur certaines bactéries à Gram négatif résistantes, permettant de traiter les patients atteints d'infections suspectées ou documentées à *Enterobacteriaceae* productrices de BLSEs ou à *Pseudomonas aeruginosa*, dans le cadre d'une stratégie d'épargne des carbapénèmes.

L'association ceftaroline-AVI a également fait l'objet de plusieurs études cliniques dont une notamment ayant pour but de comparer son efficacité et sa tolérance à celles du doripénème chez des patients atteints d'infections des voies urinaires compliquées (97). Son activité sur la flore intestinale a également été comparée à celle de l'association ceftazidime-AVI lors d'un essai de phase I (98) mais les résultats de ces études n'ont pas été encore publiés. L'avantage de la ceftaroline, par rapport à la ceftazidime et à l'ATM, est qu'il s'agit d'une céphalosporine pouvant agir à la fois sur des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif et constitue donc avec l'AVI une association à large spectre ayant une activité puissante contre les *Enterobacteriaceae* produisant diverses β -lactamases mais aussi contre les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (99).

Les associations céphalosporines-AVI ne sont néanmoins pas actives contre les carbapénémases de classe B, contrairement à l'association ATM-AVI. En effet, l'ATM ayant la particularité d'être stable vis-à-vis d'un grand nombre de MBLs, l'AVI combinée à l'ATM permet aux souches produisant diverses β -lactamases y compris des MBLs de retrouver leur sensibilité à l'ATM (63). Ce qui fait de cette nouvelle association ATM-AVI une association particulièrement prometteuse pour lutter contre les MBLs et autres β -lactamases problématiques, comme les BLSEs et les KPCs, qui peuvent être co-exprimées et contribuer à la multi-résistance. L'association ATM-AVI est actuellement en cours de développement. Une étude pharmacocinétique de phase II (REJUVENATE) menée, dans le cadre du projet Combacte-Care, chez des patients présentant des infections intra-abdominales compliquées vient de s'achever (100) alors qu'une étude de phase III (REVISIT) comparant l'efficacité de

l'association ATM-AVI à celle du méropénème pour le traitement d'infections graves causées par des bactéries à Gram négatif multi-résistantes est sur le point de débiter (101).

Résistance aux associations β -lactamine-AVI

Il est bien connu que des mutations ponctuelles peuvent conférer aux β -lactamases une résistance à l'acide clavulanique et que des mutations des porines peuvent diminuer la pénétration des inhibiteurs dans la bactérie (102). Plusieurs études se sont intéressées à examiner si ce risque s'appliquait aussi à l'AVI. Bien que l'AVI, en association avec la ceftazidime, ne soit commercialisé que depuis 2014, l'émergence de résistance chez plusieurs patients après une courte période d'exposition à l'association ceftazidime-AVI a déjà été documentée. Le premier cas d'une souche de *K. pneumoniae* productrice de carbapénémases de type KPC résistante à ceftazidime-AVI a été reporté en 2015 chez un patient n'ayant jamais été traité auparavant par cette association mais ayant été exposé à d'autres antibiotiques de façon intensive (103), ce qui pourrait avoir entraîné une pression de sélection responsable de mutations. La surexpression du gène *bla*_{KPC-3} combinée à l'inactivation de porines (OmpK35 et OmpK36) ainsi qu'à une augmentation de l'activité d'efflux sont mises en cause chez ces souches (104). D'autres études ont également révélé plusieurs cas d'échecs du traitement par ceftazidime-AVI dus à des souches de *K. pneumoniae* ayant acquis des mutations affectant la boucle Ω au niveau du site actif de KPC-2 et KPC-3 (**Figure 12**), entraînant une augmentation de l'affinité de ces β -lactamases pour la ceftazidime et une diminution de leur liaison à l'AVI, ayant pour conséquence une hydrolyse plus importante de la ceftazidime (105-107). De la même manière, des mutations dans le site actif de BLSEs de classe A (SHV et CTX-M) et de céphalosporinases déreprimées (AmpC) peuvent engendrer des résistances à l'inhibition par l'AVI (108, 109). Cependant, il a été montré que certaines souches devenues résistantes à l'association ceftazidime-AVI ou ceftaroline-AVI pouvaient perdre leur résistance à d'autres β -lactamines (105, 109).

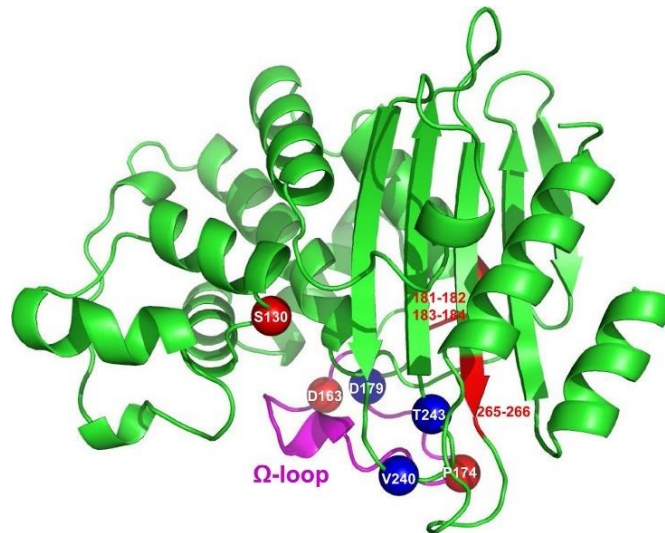


Figure 12. Structure tridimensionnelle d’une carbapénémase de type KPC montrant la position des résidus impliqués dans la résistance à l’association ceftazidime-AVI (en bleu, position des substitutions naturelles ; en rouge, position des substitutions/insertions identifiées seulement dans des variants de laboratoire) (d’après Docquier JD, 2018 (75)).

La probabilité d’apparition d’une résistance à l’AVI est faible (taux de mutations spontanées $\sim 10^{-9}$) et, pour les différents cas rencontrés à ce jour, il est plus probable que les mutations conférant la résistance aient évolué indépendamment dans différentes souches et dans différents patients (105). Cependant, il est à craindre que les résistances continuent à émerger avec l’utilisation accrue des nouvelles combinaisons associant une β -lactamine à l’AVI ou d’autres nouvelles molécules ayant une activité contre les *Enterobacteriaceae* productrices de carbapénémases et que les plasmides portant les gènes mutants se disséminent par transfert horizontal. Il est donc important que des tests soient développés pour détecter le plus rapidement possible les souches résistantes et comprendre le mécanisme de résistance sous-jacent afin d’adapter au mieux le traitement et préserver ces nouvelles associations.

2.2.3. Autres inhibiteurs de β -lactamases en cours de développement

2.2.3.1. Les diazabicyclooctanones

L'AVI, premier représentant de la classe des diazabicyclooctanones (DBO) et puissant inhibiteur à large spectre, a servi de point de départ pour le développement de toute une nouvelle génération d'inhibiteurs de β -lactamases (**Figure 13**).

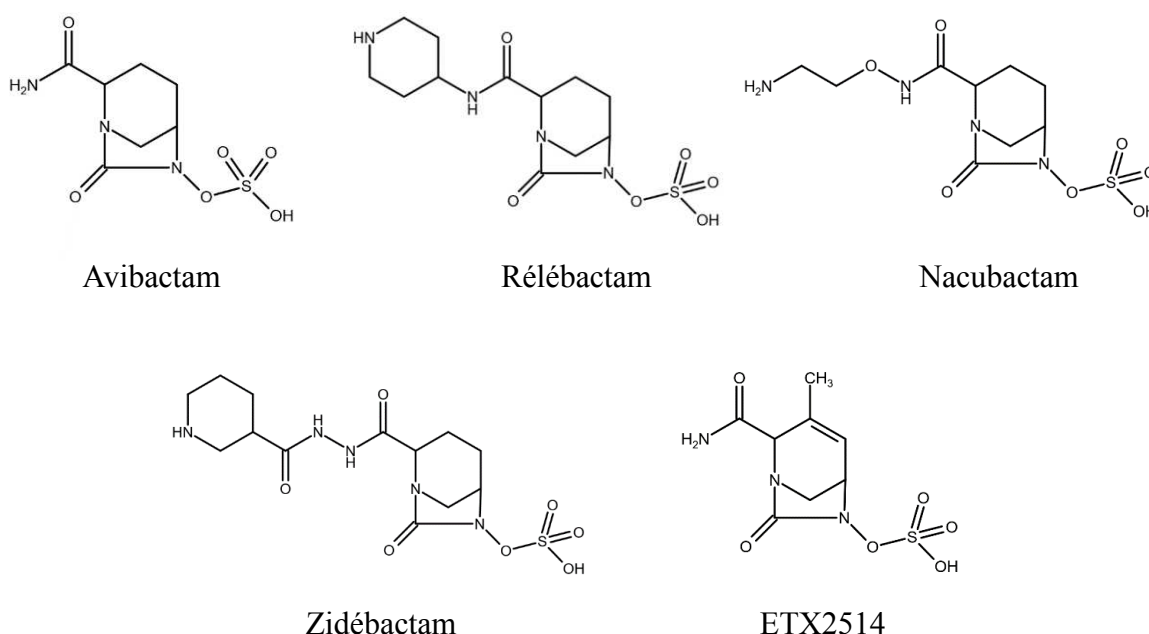


Figure 13. Structure chimique des inhibiteurs de β -lactamases de la classe des diazabicyclooctanones.

Le **rélebactam** (MK-7655) est un dérivé de l'AVI en cours de développement en association avec l'imipénème et la cilastatine. Le rélebactam a des propriétés très similaires à celles de l'AVI avec une forte activité contre les β -lactamases de classe A et C, mais il exerce néanmoins une plus faible activité que l'AVI envers les carbapénémases de type OXA-48 (110, 111). Une étude évaluant l'activité *in vitro* de l'association imipénème-rélebactam vis-à-vis de souches d'*Enterobacteriaceae* avec divers mécanismes de résistance a montré que la CMI de l'imipénème diminuait de 2-16 mg/L à <1 mg/L en présence de 4 mg/L de rélebactam (110). En revanche, même une concentration de 32 mg/L de rélebactam ne permettait pas de

réduire la CMI de l'imipénème pour les souches exprimant des MBLs de classe B (IMP, NDM, VIM). Dans une autre étude, évaluant l'efficacité de cette association contre plus de 200 souches de *P. aeruginosa*, le rélébactam permettait de rétablir la sensibilité de la majorité des souches à l'imipénème, les souches restant résistantes étant celles produisant des carbapénémases de classe B en plus d'exprimer faiblement la porine OprD (112). Deux essais cliniques de phase II réalisés à ce jour ont indiqué que l'imipénème-cilastatine associé au rélébactam était aussi efficace que l'imipénème-cilastatine seul pour le traitement des infections intra-abdominales compliquées (113) et des infections compliquées des voies urinaires, y compris la pyélonéphrite aiguë (114). Plusieurs études cliniques de phase III visant à évaluer l'efficacité et la tolérance de l'association imipénème-cilastatine-rélébactam pour le traitement d'infections graves causées par des bactéries résistantes sont en cours (115-117).

Le **nacubactam** (RG6080, FPI1459, OP0595), autre DBO, a la particularité d'être un inhibiteur puissant à la fois des β -lactamases mais aussi des PLP2 (79, 118, 119). Le nacubactam présente une activité similaire ou légèrement inférieure à celle de l'AVI envers les β -lactamases de classe A, C et D (79). Et comme l'AVI, il n'inhibe pas les MBLs, comme indiqué par des valeurs d' $IC_{50} > 0.3$ mM (**Tableau 2**). Cependant, le nacubactam a une activité antibactérienne intrinsèque supérieure (CMIs = 1-8 mg/L pour un grand nombre de souches d'*Enterobacteriaceae*) à celle de l'AVI (CMIs = 8-32 mg/L) due à une plus forte affinité de liaison du nacubactam pour les PLP2 ($IC_{50} = 370$ nM pour le nacubactam contre 1850 nM pour l'AVI) (79). De plus, de par l'inhibition des serine- β -lactamases et des PLP2, le nacubactam a montré une activité synergique remarquable, qualifiée d'« enhancer effect », avec différentes β -lactamines telles que la pipéracilline, la céfépime et l'ATM se liant à d'autres PLPs (79). Plusieurs études ont indiqué que le nacubactam continuait à potentialiser l'effet de l'antibiotique associé chez des souches mutantes d'*Enterobacteriaceae* résistants au nacubactam et n'exprimant pas de β -lactamases (79, 118). Une étude de phase I ayant pour but de caractériser la pénétration intra-pulmonaire du nacubactam chez des volontaires sains vient de s'achever (120) mais la β -lactamine qui sera combinée au nacubactam pour les études cliniques à venir n'est actuellement pas spécifiée.

Le **zidébactam** (WCK 5107) est un autre exemple de DBO exerçant un effet potentialisateur similaire à celui du nacubactam, dû également à une forte inhibition des PLP2 (121).

L'AVI, le rélébactam, le nacubactam et le zidébactam inhibent principalement les β -lactamases de classe A et C et seulement un nombre limité de β -lactamases de classe D telles que les OXA-48. Des modifications de la structure des DBO ont donc été apportées afin d'étendre leur spectre d'activité pour inclure une large gamme d'enzymes de classe D tout en améliorant davantage l'inhibition des β -lactamases de classe A et C. C'est ainsi qu'a été développé le nouvel inhibiteur **ETX2514** qui, à la différence de l'AVI, contient une double liaison endocyclique et un groupement méthyle (**Figure 13**) (122, 123). Ces différences structurales permettent de renforcer la puissance de cette molécule en tant qu'inhibiteur des β -lactamases par rapport à l'AVI et au nacubactam (**Tableau 2**) et d'étendre son utilité via l'inhibition d'une large gamme de β -lactamases de classe D (123) qui contribuent à la résistance aux β -lactamines, en particulier chez *A. baumannii* (124).

Tableau 2. Comparaison de l'activité inhibitrice de l'AVI et du nacubactam contre diverses β -lactamases

Enzyme	IC ₅₀ (nM)			Références
	AVI	Nacubactam	ETX2514	
Classe A				
TEM-1	6.97	26.1	-	(79)
TEM-10	12.9	95.7	-	(79)
CTX-M-14	2.99	9.49	-	(79)
CTX-M-15	1.00	13.1	-	(79)
CTX-M-44	4.40	22.0	-	(79)
KPC-2	186	869	4	(79, 122)
Classe C				
<i>E. cloacae</i> AmpC	923	845	-	(79)
<i>P. aeruginosa</i> AmpC	401	271	14	(79, 122)
CMY-2	43.6	15.0	-	(79)
Classe D				
OXA-1	130	3050	-	(79)
OXA-2	485	1070	-	(79)
OXA-23	2 320	46 400	-	(79)
OXA-24	16 000	-	190	(122)
Classe B				
IMP-1	> 300 000	> 300 000	-	(79)

L'ETX2514 inhibe également les PLP2 et présente une activité antibactérienne contre les *Enterobacteriaceae*, y compris les souches multi-résistantes productrices de carbapénémases (MIC = 0.125-8 mg/L) (122). De plus, cette molécule a été conçue de façon à améliorer sa diffusion à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif. La capacité de l'ETX2514 à potentialiser l'activité de différentes β -lactamines a été évaluée *in vitro* contre un grand nombre d'isolats cliniques de différentes espèces. La CMI₉₀ de chaque β -lactamine testée (imipénème, méropénème, ATM et ceftazidime) en association avec 4 mg/L d'ETX2514 était ≤ 0.12 mg/L pour *E. coli* et *K. pneumoniae* tandis que l'association la plus puissante contre *P. aeruginosa* était imipénème-ETX2514 (MIC₉₀ = 2 mg/L) et sulbactam-ETX2514 contre *A. baumannii* (MIC₉₀ = 4 mg/L) (122), le sulbactam ayant une activité antibactérienne intrinsèque contre les souches d'*Acinetobacter* liée à l'inhibition des PLP3 (125). Ainsi, son activité antibactérienne intrinsèque contre les *Enterobacteriaceae* et son large spectre d'inhibition des β -lactamases (le plus large décrit à ce jour), se traduisent par une activité efficace à la fois contre les *Enterobacteriaceae* résistantes aux carbapénèmes, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* multi-résistants et font de l'ETX2514 un candidat idéal pour plusieurs combinaisons avec les β -lactamines pour traiter les infections à Gram négatif multi-résistantes. L'ETX2514 est actuellement en développement clinique de phase I (<https://clinicaltrials.gov>).

2.2.3.2. Les dérivés de l'acide boronique

Toutes les β -lactamases, quelle que soit leur classe, partagent une caractéristique commune de leur mécanisme catalytique qui consiste en la formation d'un ou deux intermédiaires tétraédriques durant la réaction d'hydrolyse (4). Par conséquent, les composés capables de mimer de tels intermédiaires sont de bons candidats pour devenir de puissants inhibiteurs de ces enzymes.

Les acides boroniques sont connus pour leurs propriétés d'inhibiteurs des sérine-protéases depuis le début des années 1970 (126). L'inhibition des sérine- β -lactamases par les dérivés de l'acide boronique a été décrite pour la première fois en 1978 par Kiener et Waley (127) et depuis, un grand nombre de dérivés ont été synthétisés et testés pour leur activité inhibitrice contre toutes les classes de β -lactamases. Mécaniquement, l'affinité des acides boroniques pour ces enzymes est due à la formation d'un adduit covalent entre le

résidu catalytique sérine de la β -lactamase et l'atome de bore électrophile qui agit comme l'atome de carbone électrophile de la fonction carbonyle du noyau β -lactame, mimant ainsi l'état de transition tétraédrique du mécanisme hydrolytique (**Figure 14**) (128).

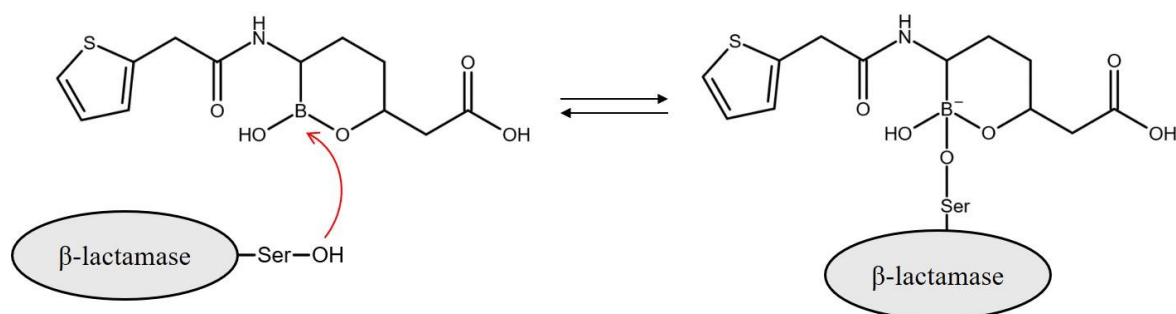


Figure 14. Mécanisme d'inhibition des sérine- β -lactamases par le vaborbactam, dérivé de l'acide boronique.

Récemment, un dérivé cyclique d'acide boronique, le **vaborbactam** (RPX7009), actif contre les β -lactamases de classe A et C, a été découvert (128). Ce nouvel inhibiteur a la particularité d'être plus puissant contre les carbapénémases de classe A, telles que KPC, que contre les BLSEs (en particulier TEM et SHV) et les β -lactamases de classe C (129). De plus, aucune inactivation du vaborbactam par KPC n'a été observée (130, 131), ce qui contraste avec ce qui a été rapporté pour d'autres inhibiteurs incluant l'AVI (76). En revanche, comme la plupart des autres inhibiteurs de β -lactamases disponibles, le vaborbactam n'inhibe pas les carbapénémases de classe B et D. Une étude a indiqué que le vaborbactam entraînait une réduction plus importante de la CMI des carbapénèmes que des autres classes de β -lactamines, chez les souches productrices de KPC (129). En se basant sur les valeurs de CMI₉₀, il a été montré également que l'association méropénème-vaborbactam était 4 fois plus puissante que l'association ceftazidime-AVI et au moins 64 fois plus puissante que le méropénème seul contre des isolats cliniques d'*Enterobacteriaceae* produisant des KPCs (132). Le vaborbactam semble très sélectif des sérine- β -lactamases, pouvant ainsi potentialiser l'effet thérapeutique du biapénème et du méropénème contre des souches résistantes de *K. pneumoniae* dans un modèle murin d'infection pulmonaire, sans inhiber les sérine-protéases de ces mammifères (IC₅₀ $\geq$ 1000 μ M) (128). Toutes ces propriétés ont ainsi permis de mener à bien les essais cliniques de phase I du vaborbactam seul (133) ainsi qu'en

association avec le biapénème (134) ou le méropénème (135-137). Un essai clinique de phase III a rapporté la supériorité du méropénème-vaborbactam par rapport à l'association pipéracilline-tazobactam pour le traitement d'infections urinaires compliquées, y compris la pyélonéphrite aiguë (138). Comparé aux meilleurs traitements disponibles, l'association méropénème-vaborbactam a également démontré des taux de guérison plus élevés pour le traitement d'*Enterobacteriaceae* résistantes aux carbapénèmes (139). Cela a permis à cette association d'obtenir, en 2017, l'autorisation de mise sur le marché américain auprès de la FDA sous le nom de spécialité Vabomere[®], dans l'indication de prise en charge d'infections compliquées des voies urinaires y compris la pyélonéphrite.

Des chercheurs se sont intéressés à modifier la structure du vaborbactam de façon à obtenir une meilleure activité inhibitrice contre les MBLs. Des molécules candidates prometteuses (**RPX7307**, **RPX7381**, **RPX7400**), toujours aussi puissantes contre les sérine-carbapénémases mais avec une activité nettement améliorée contre les OXA- et métallobarbapénémases, ont ainsi été synthétisées (140, 141). Ces molécules montrent une bonne activité synergique avec les carbapénèmes, et sont notamment capables de restaurer leur sensibilité à des souches productrices de NDM-1 ou de VIM-1 à des concentrations aussi faibles que 0.6 µg/mL (140). Ces nouveaux inhibiteurs ne sont pas encore en phase de développement clinique mais la découverte de ces molécules à large spectre d'inhibition des carbapénémases fournit une stratégie puissante pour préserver et améliorer l'utilité clinique des carbapénèmes.

2.2.3.3. Les inhibiteurs de métallob- β -lactamases

Les MBLs, qui constituent la classe B des β -lactamases, sont des métallobenzyl-enzymes contenant un ou deux ions zinc dans leur site actif. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser toutes les classes de β -lactamines, à l'exception des monobactames, et sont résistantes à tous les inhibiteurs disponibles en clinique (67). Par conséquent, les MBLs représentent l'un des facteurs de résistance bactérienne les plus inquiétants et c'est pour cette raison que la recherche de nouveaux et puissants inhibiteurs de MBLs est d'une importance primordiale. Les efforts déployés par de nombreux laboratoires ont permis d'identifier de nouvelles substances chimiques que l'on peut distinguer selon leur mécanisme d'action.

Les inhibiteurs de liaison au zinc

Les composés contenant un atome de soufre, fixant le zinc du site actif, constituent l'une des principales catégories d'inhibiteur de MBLs (142). Le **captopril**, par exemple, qui est un puissant inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et qui est utilisé pour le traitement de l'hypertension, possède un groupement thiol et un groupement carboxylate capables de former des liaisons avec les ions métalliques. L'efficacité du captopril est variable en fonction de la stéréochimie du captopril et du variant de MBL considéré avec des IC_{50} pouvant aller de 0.072 à $> 500 \mu M$ (143). Il a été montré que le D-captopril pouvait potentialiser l'efficacité du méropénème contre de nombreux pathogènes exprimant différentes MBLs (VIM-2, VIM-4, IMP-4 and NDM-1) (143). D'autres molécules (**thiorphan**, **dimercaprol**, **tiopronine**), contenant des groupements thiols ou carboxylates dans leur structure et déjà commercialisées dans d'autres indications, ont également montré des propriétés inhibitrices intéressantes avec des valeurs d' IC_{50} de l'ordre du micromolaire vis-à-vis de NDM-1, IMP-7 et VIM-1 et la capacité de restaurer la sensibilité de souches productrices de MBLs à l'imipénème (144). Plus récemment, il a été décrit que les **bisthiazolidines**, qui présentent des caractéristiques communes avec les β -lactamines et qui possèdent non seulement un groupement thiol mais aussi des groupements amine et carboxylate, pouvaient inhiber les MBLs de type NDM-1 (145) et VIM-2 (146).

L'inhibition des MBLs par les **acides di-carboxyliques** a également été largement étudiée (142). Comme pour les dérivés thiolés, un anion carboxylate relie les deux ions zinc du site actif des MBLs tandis que le second anion carboxylate interagit avec un résidu sérine ou lysine. Il a été montré qu'un dérivé de l'acide maléique, le **ME1071**, pouvait potentialiser l'activité des carbapénèmes et des céphalosporines contre des isolats cliniques producteurs de MBLs (147, 148) mais aussi améliorer la survie dans un modèle murin d'infection pulmonaire due à une souche de *P. aeruginosa* productrice de MBLs (149).

Les inhibiteurs chélatant le zinc

Un moyen évident d'inhiber les MBLs (aussi bien que les métallo-enzymes) est d'utiliser des agents chélatant, comme l'EDTA, pour isoler et extraire l'ion zinc de ces enzymes. Bien qu'efficaces, de tels composés sont non spécifiques et donc potentiellement associés à des problèmes de cytotoxicité. Cependant, une étude a montré que l'EDTA

complexé au calcium (**ca-EDTA**) permettait d'augmenter l'efficacité de l'imipénème dans un modèle murin de pneumonie, non seulement en inhibant les MBLs produites par la souche de *P. aeruginosa* responsable de l'infection mais aussi en limitant les dommages tissulaires causés par les métallo-protéases produites par le pathogène (150).

La phytotoxine **aspergillomarasmine A** (AMA), dérivé de l'acide L-aspartique, inhibe les enzymes VIM-2 et NDM-1 en complexant les deux ions zinc de leur site actif grâce aux propriétés chélatantes des 4 groupements carboxyle et 3 groupements amine de l'AMA (151). De plus, chez des souris infectées par une souche de *K. pneumoniae* exprimant NDM-1, l'AMA restaure efficacement l'activité du méropénème.

L'intérêt croissant pour ce type d'inhibiteurs est également illustré par l'identification de composés chimiques qui diffèrent significativement de l'EDTA ou de l'AMA, mais qui possèdent des propriétés de chélation du zinc similaires, et qui peuvent donc potentiellement inactiver les MBLs. Falconer et ses collègues ont, par exemple, évalué une série de composés spiro-indoline-thiadiazolés pour leur potentiel d'inhibition des MBLs (152). L'étude a démontré la capacité d'un des analogues testés à inhiber les NDM-1 *in vitro*, et que, dans un modèle murin d'infection péritonéale, son association avec le méropénème entraînait une diminution significative de la densité bactérienne comparé aux animaux ayant reçu le traitement antibiotique seul.

Les inhibiteurs covalents

Une étude a démontré que l'**ebselen**, molécule synthétique ayant des propriétés anti-inflammatoire et antioxydante, pouvait également agir en tant qu'inhibiteur puissant des NDM-1 en formant une liaison covalente avec le résidu cystéine du site actif et pouvait restaurer l'activité du méropénème contre des souches d'*E. coli* productrices de NDM-1 (153). L'activité de cette molécule est due à l'ouverture du cycle sélénazole de l'ebselen et la formation d'une liaison covalente avec le groupement thiol du résidu cystéine de l'enzyme entraînant alors la perte de l'ion zinc et la destruction complète de la conformation du site actif (**Figure 15**).

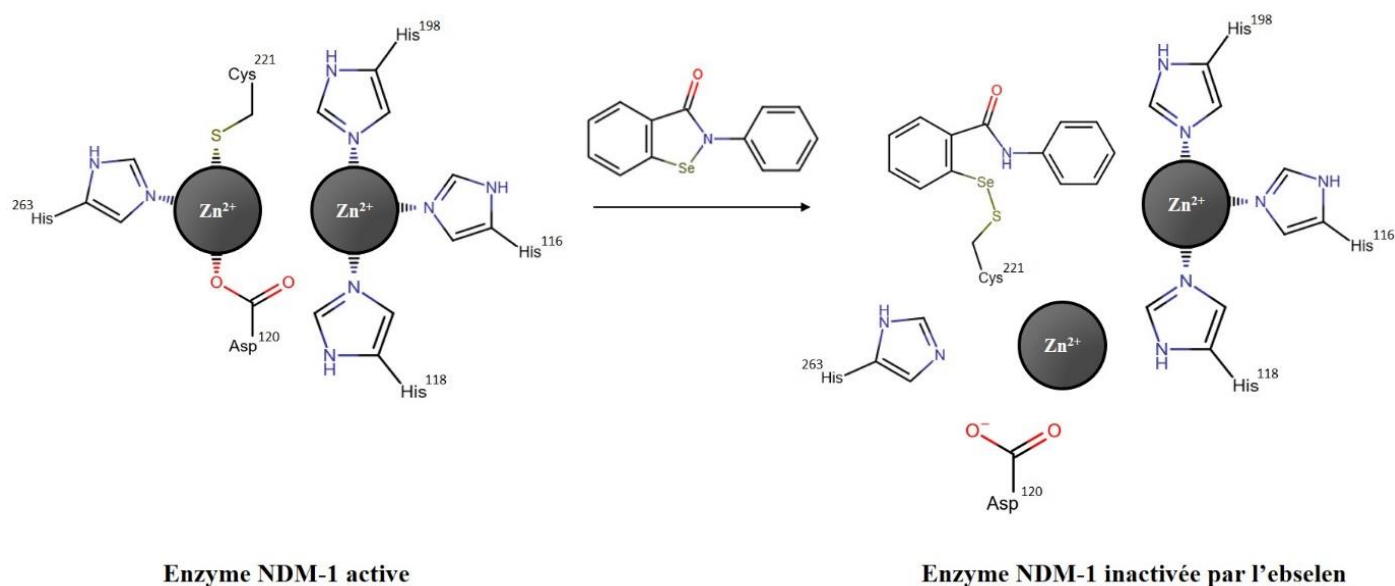


Figure 15. Mécanisme d'inhibition de la métallo-β-lactamase NDM-1 par l'ebsele (d'après Chiou J et al., 2015 (153)).

L'ebsele fait déjà l'objet d'essais cliniques chez l'Homme pour le traitement de diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, l'ischémie cérébrale, l'accident vasculaire cérébral, l'athérosclérose... (154), et pourrait donc être un candidat prometteur pour le développement clinique d'un futur inhibiteur covalent de MBLs. Cependant, *in vivo*, sa liaison à de nombreuses enzymes impliquées dans divers processus biologiques pourrait entrer en compétition avec son activité inhibitrice des MBLs. De plus, des études ont prouvé que l'ebsele pouvait être toxique pour les cellules eucaryotes (154), ce qui limite son potentiel de développement clinique. La stratégie future devrait donc se concentrer sur l'amélioration de sa spécificité aux MBLs et la réduction de sa toxicité.

Dans la même lignée, une autre molécule, le **3-formylchromone**, a montré qu'elle pouvait inhiber les NDM-1 par formation d'une liaison covalente avec le résidu lysine du site actif (155).

Désormais, il ne reste plus qu'à espérer que, comme les inhibiteurs covalents des sérine-β-lactamases, les inhibiteurs des MBLs atteindront le stade de développement clinique. Cependant, les MBLs faisant partie d'une vaste famille de métalloprotéines présentes dans

tous les règnes du vivant et présentant des types d'activités très variables, il n'est pas facile de trouver des inhibiteurs spécifiques dépourvus d'effets secondaires sur les protéines humaines.

Pour résumer, la

Figure 16 présente le spectre d'inhibition de tous les inhibiteurs de β -lactamases décrits dans ce manuscrit.

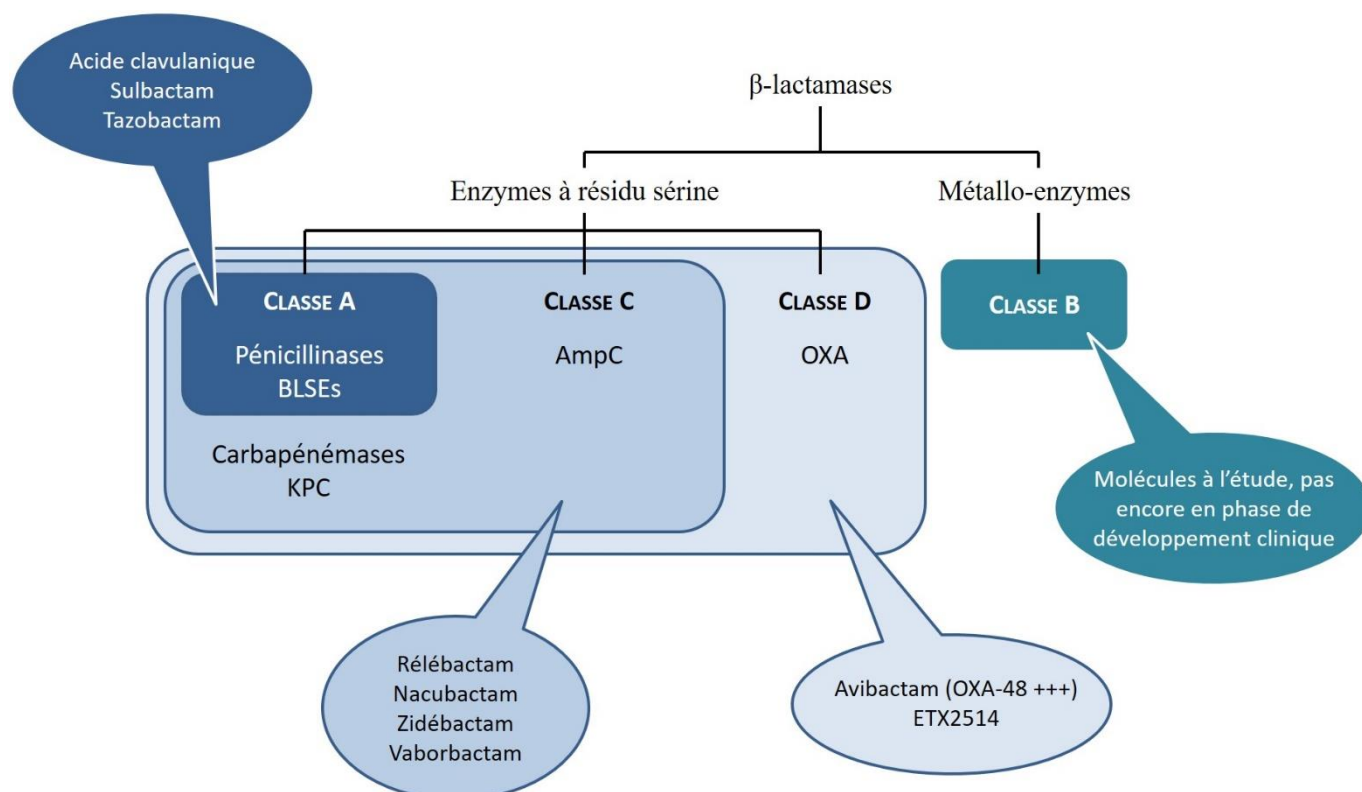


Figure 16. Spectre d'inhibition des inhibiteurs de β -lactamases.

3. PHARMACOCINETIQUE DES ANTIBIOTIQUES AU NIVEAU DU SITE INFECTIEUX

En décrivant la relation entre la dose administrée d'un médicament et l'évolution des concentrations de ce médicament au cours du temps dans l'organisme, la pharmacocinétique (PK) constitue un élément central dans le développement des médicaments et dans la sélection de schémas posologiques appropriés. La PK est responsable d'une grande partie de la variabilité de l'effet d'un médicament. Elle peut varier considérablement entre les patients et au sein même des patients et il est donc nécessaire de prendre en compte cette variabilité pour éviter des sous ou surdosages.

Les études PK portant sur les antibiotiques reposent le plus souvent sur la détermination des concentrations totales plasmatiques. Or la plupart des infections se produisent dans le fluide extracellulaire des tissus. Par conséquent, la détermination des concentrations libres en antibiotique dans le liquide extracellulaire au niveau du site d'infection présente un intérêt majeur afin de prédire l'activité antimicrobienne des antibiotiques au cours du temps et donc d'optimiser leur utilisation. Ce sujet a fait l'objet d'une **revue publiée dans le journal Pharmacological Research** en Juin 2016, présentant le principe ainsi que les points forts et les limites des différentes méthodes utilisées à ce jour pour étudier la distribution tissulaire des antibiotiques, en particulier la microdialyse qui est considérée comme la technique de référence. La façon dont les concepts PK de base tels que les facteurs gouvernant la distribution tissulaire peuvent aider à prédire ou interpréter les concentrations tissulaires d'antibiotiques obtenues par microdialyse a également été décrite.

Article I (revue) :

Microdialysis as a way to measure antibiotics concentration in tissues

Sandrine Marchand^{1,2,3}, Alexia Chauzy^{1,2}, Claire Dahyot-Fizelier^{1,2,4}, William Couet^{1,2,3}

¹ Inserm U1070, Pôle Biologie Santé, 1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France

² Université de Poitiers, UFR Médecine-Pharmacie, 6, rue de la Milétrie, TSA 51115, 86073 Poitiers Cedex, France

³ CHU Poitiers, Service de Toxicologie-Pharmacocinétique, 2 Rue de la Milétrie, CS 90577, 86021 Poitiers, France

⁴ CHU Poitiers, Département d'Anesthésie Réanimation, 2 Rue de la Milétrie, CS 90577, 86021 Poitiers, France

Pharmacological Research. 2016, 111: 201-207.

ABSTRACT

As for all other drugs, antibiotics must reach their pharmacodynamic target in order to exert their effect, but because infection may occur in various tissues the distribution of antibiotics has always been of particular concern. In this article, we will first critically review the various methodologies available to study antibiotics tissue distribution, including microdialysis, secondly we will show how basic pharmacokinetic concepts may help to predict or interpret antibiotics tissue distribution and third we will address the question of linking antibiotics tissue distribution with their antimicrobial effect, using modern pharmacokinetic-pharmacodynamic methods.

Keywords: microdialysis; distribution; tissue, antibiotics; pharmacokinetics; pharmacodynamics

Nosocomial infections due to multiple drug resistant (MDR) Gram (-) bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* or *Klebsiella pneumonia* have dramatically increased during the last decade and no new antibiotics are expected within the next years to face this major threat. Since not so many options are available in the short term, dosing optimization of presently available antibiotics, relying on proper use and understanding of their pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) relationships is becoming a key issue. The objective is triple: 1) increase antimicrobial efficacy, 2) limit toxicity and 3) avoid selection and development of resistant mutants.

Antibiotic selection is mainly based on MIC, using susceptibility breakpoints that are defined by comparing the antibiotic concentrations to the MIC, and although total plasma concentrations are most often used, unbound concentrations at the infection site should rather be considered. Yet MIC is a static parameter whereas *in vivo* antibiotics concentrations most often vary with time. Furthermore MIC depends on the growth and death rates and therefore different combinations may generate the same MIC. But perhaps more importantly MIC is a time-averaged parameter that does not reflect bacteria adaptation or resistant mutant selection that may occur within a few hours, in particular with life-threatening nosocomial infections due to MDR Gram(-) bacteria. Therefore, such usual *in vitro* setting and static conditions may hardly reflect a dynamic situation in a target organ.

Why and How to determine antibiotics tissue concentrations?

For bacteria, including MDR Gram (-) bugs, that do not penetrate within cells, the infection site corresponds most often to the interstitial space fluid (ISF) and thereby antibiotics concentrations should rather be quantified in tissues ISF or other relevant body fluids than in plasma¹. Accordingly, the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) have recommended determining the tissue pharmacokinetics into the application dossier of antimicrobial agents. However, the choice of the method remains challenging and may vary with the antibiotics, indications and infection localization^{2,3}. Indeed, it has been emphasized that no single “optimal” technique exists and that the tool for assessing target site drug levels should be chosen carefully on a case by case basis. As an example, the lung is divided into several compartments that may not be easily accessible to drugs and in ICU patients with nosocomial infections, antibiotics concentrations

are usually determined within the epithelial lining fluid (ELF) after broncho-alveolar lavage (BAL), whereas in cystic fibrosis patients they are measured in the sputum. The choice of a sampling matrix is therefore important because antibiotics concentrations may vary accordingly ^{4,5} but also because bacteria may be predominantly located within the ELF, the bronchial mucosa, or within cells ^{5,6}.

It is important to mention that tissue biopsies have been for long the most popular way to investigate antibiotics tissue distribution. As opposed to other drugs that are used to correct or prevent organ dysfunction by reaching and then interacting with pharmacological receptors located at a specific site in the body, antibiotics need to target bacteria that may be located in many different tissues or body fluids. This is the reason why antibiotic distribution studies have been historically conducted in all sorts of organs such as lung, kidney, prostates... In fact biopsies are relatively easy to perform, including in human, and the only real limitation is that only a limited number of biopsies can be taken from a given subject, precluding full description of concentrations versus time profiles in the same individual. Another major problem is that measurements from tissue biopsies yield total drug concentrations, and therefore cannot discriminate between antibiotics with totally different distribution characteristics, such as those mostly concentrated in cells and others only present in the extracellular fluid. Assuming that only the unbound fraction of the antibiotic present within the aqueous space of the infected tissue can exert anti-infective efficacy ^{7,8}, one may understand that whole tissue concentrations would underestimate the effect site concentrations of drugs that remain exclusively within the extracellular space, such as β -lactams ^{7,9,10} and that in turn, it would overestimate of effect site concentrations of drugs that accumulate within cells, such as macrolides. Therefore total drug concentrations estimated from biopsy, are increasingly considered of minor relevance ^{11,12}. Noticeably positron emission tomography (PET) is a modern imaging technique that may be used with certain restrictions to assess drugs tissue distribution ^{13,14}, but which would also be able to measure total tissue drug concentrations.

The skin blister technique has also been used for many years to measure antibiotics concentrations in tissues ^{15,16}. Blisters may be induced by suction or by application of cantharidin on the skin. Drug concentration may then be measured within the fluid produced between epidermis and dermis. Yet this procedure is difficult to standardize and creates

inflammation with proteins present in the blister fluid, which introduces a bias for antibiotics with extensive protein binding ¹⁷.

Microdialysis (MD) was introduced as a very promising new technique that could be used in human for on-line determination of unbound drug concentrations ¹⁸ including antibiotics ⁷ in tissue interstitial fluid (ISF). It has rapidly gained popularity in pharmacokinetic and pharmacodynamic studies, both in experimental animals and humans. The principle of MD is based on a concentration difference between two fluid compartments across a semi-permeable membrane present in a probe. The probe is introduced in the tissue that contains the analyte of interest and the perfusion fluid is infused through it with a pump at a flow rate equal to few $\mu\text{L}/\text{min}$. The analyte may then diffuse through the semi-permeable probe membrane, driving the outflow of the “recovered” fluid containing this analyte as well as various solutes from the tissue. This fluid is collected in microvials and is called dialysate. MD was initially used in experimental neurosciences during the 1970’s ¹⁹. The objective was to quantify endogenous compounds such as neurotransmitters, and therefore to assess the relative change of a baseline value in certain circumstances, such as the administration of a pharmacological reactant or of a new drug candidate in order to characterize or confirm a mechanism of action. In this situation there is no need to estimate the actual concentration of the analyte, but simply a relative change. The problem is totally different when the analyte is an exogenous compound, such as an antibiotic, since in this case there is no baseline value and therefore results cannot simply be expressed in relative changes. The problem is that because equilibrium between the extracellular fluid and the perfusion fluid cannot be reached, drug concentrations measured within the dialysate correspond only to a fraction of the actual unbound concentrations in the tissue ISF. This ratio is referred to as the “relative recovery” and a calibration procedure is required to estimate this recovery and then to correct measured into actual concentrations. Noticeably *in vivo* recovery is much lower than *in vitro* recovery and one cannot be estimated from the other.

The no-net-flux was the first method developed to estimate *in vivo* probe recovery and actual extracellular concentrations (C_{ECF}) but it could only be used following continuous infusion at steady state ²⁰. After intravenous infusion of the drug of interest at a certain rate and until steady-state is reached, the MD probe perfusion fluid is supplemented with increasing concentrations of this same drug (C_{in}) and concentrations recovered in dialysates (C_{out}) are measured. Differences between C_{in} and C_{out} are then calculated and plotted as a

function of C_{in} . The resulting curve crosses the x-axis when C_{in} equals C_{out} which represents the no-net-flux conditions and allows determination of C_{ECF} . The slope of the regression line characterizes probe recovery. The main limitation of this technique is that only a unique value of ECF can be estimated at steady-state and concentrations versus time profiles after bolus administrations cannot be obtained^{21,22}. Yet, a few examples of applications of the no-net-flux method can be found in the literature, as for example to determine rifampin concentrations in different human brain compartments by MD²³. As an alternative the dynamic-no-net-flux method was developed²⁴. In brief the intravenous infusion rate is let to vary but not the drug concentration within the MD probe perfusion fluid. Similarly to the no-net-flux-method, differences between C_{in} and C_{out} are plotted as a function of C_{in} and as a function of time, allowing determination of mean C_{ECF} concentrations as a function of time^{21,22}. This technique does not require to be at steady-state and although it requires a large number of animals, it was used to investigate sparfloxacin brain distribution in mice²⁵. Noticeably this method cannot be used in human.

Retrodialysis methods are by far the most popular to determine *in vivo* probes recoveries. They rely on the assumption that because passive diffusion governs drug exchanges through the MD membranes, these movements should occur similarly in both directions. In other words recovery by gain corresponding to drug transfer from the outside to the inside of the MD probe, should be equal to recovery by loss corresponding to drug transfer from the inside to the outside of the MD probe (**Figure I.1**). And recovery by gain must be known in order to convert measured into actual concentrations. This information can be obtained by estimating the recovery by loss of the drug itself and then the procedure is called “retrodialysis by drug”, or by using a calibrator and then the method is called “retrodialysis by calibrator”²⁶. In practice retrodialysis by drug is most often preferred to retrodialysis by calibrator because selecting and validating this calibrator adds to the process complexity and may take several weeks or months²⁷. Furthermore for clinical studies the calibrator must be available in a form that can be safely used in human. However estimating recovery by loss of the drug itself requires that there is no drug present in the target tissue (**Figure I.1**), which in practice means that calibration should ideally be done before drug administration, which is not always compatible with clinical practice. This difficulty occurs when the distribution study has to be done at steady-state or at least after the patient has already received several doses, which is almost unavoidable when treatment needs to be initiated rapidly before informed consent may be obtained. An opportunity exists when the drug elimination half-life is short

compared with the dosing interval since tissue concentrations are sufficiently low at the end of the dosing interval to allow for the estimation of recovery by gain ²⁸. But if the elimination half-life is longer or if the antibiotic is given by continuous infusion, recovery by calibrator is the only choice. Another advantage of this technique is that it should be able to correct for changing recovery with time which is usually neglected, considering that most MD experiments are probably no longer than 12 hours, but which could become a problem in longer investigations, required for instance for drugs with longer half-lives. In fact the stability of recovery with time has been very rarely verified and only in animal studies ²⁹, since this would be hardly possible in human. The final advantage of retrodialysis by calibrator is that it does not increase study duration. Recovery by drug by itself probably takes at least one hour, corresponding for example to 3 dialysates collected over 20 min, with the first one that may have to be discarded, but considering the necessary equilibrium and washout periods, the whole process takes at least two to three hours. Because of these constraints MD experiments in patients have occasionally been conducted without rigorous estimation of individual probes recoveries ^{30,31}. Using a single average recovery value is not advisable because recovery may vary widely between probes. This may be illustrated by a study conducted by Karjagin et al. to investigate meropenem distribution in the peritoneal fluid in critical care patients with peritonitis, where the average probe recovery was 77.3% and individual values varied between 38.5 and 90.3% ³².

MD probe recovery must be as high as possible because of analytical constraints, but it is also recognized that in order to be estimated accurately, probe recovery should be higher than 20% ²⁶. Probe recovery depends upon several factors, among which probe size hence its exchange surface ²¹. Therefore, low probe recoveries constitute a real problem during experiments such as MD brain distribution studies in small animals, as described by Chenel et al. with a mean *in vivo* recovery of ciprofloxacin in rats equal to 9.4 ± 2.8 % using a membrane length of 1mm ³³. This problem is of much less concern during experiments in the human muscle conducted with probe membranes between 10 and 30 mm length ^{28,34}. The other parameter that has a major impact on recovery is the perfusate flow, which is usually in the range of 0.3-2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ ^{28,35}. But the lower the flow the higher the recovery, so that a compromise has to be found between perfusate flow and dialysate fractionation, or between high probe recovery and time resolution.

The composition of MD probe membranes also has an effect on recovery. Commercially available membranes are mostly made in polyarylethersulphone (PAES). Although polyamide, polyethersulfone or cuprophane may also be found occasionally, the choice is relatively limited.

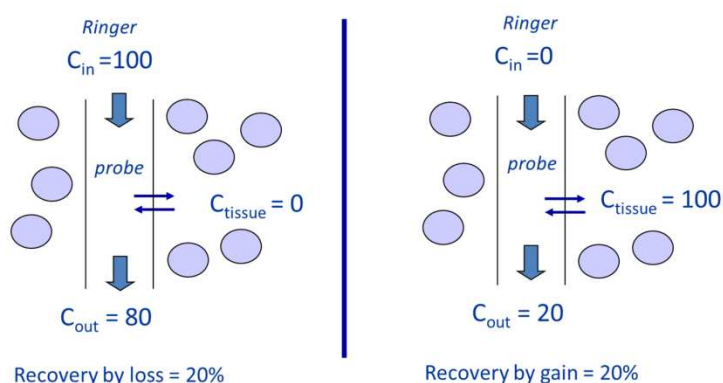


Figure I.1: Illustration of probe recovery determination methods. With the recovery by drug method, drug recovery by loss is typically determined first, that is before treatment initiation, in order to ensure that there is no drug within tissue. The perfusion fluid (Ringer) entering the probe is supplemented by the drug at a known concentration (C_{in}), concentration in collected dialysates (C_{out}) is measured, and recovery by loss (R) is estimated according to $R = (C_{in} - C_{out}) / C_{in}$, here $(100 - 20) / 100 = 80\%$ (Left). Then after washout and equilibration periods, drug is administered and this recovery value is used to estimate the actual ISF drug tissue concentrations (C_{tissue}) from those measured in the dialysates (C_{out}) according to: $C_{tissue} = C_{out} / R$, here $20 / 0.2 = 100$ (Right). With the recovery by calibrator method, a calibrator is added to the perfusion fluid and the recovery by loss of this calibrator is estimated instead of that of the drug itself but after it was established that calibrator recovery by loss is equal to drug recovery by gain. The drug of interest and the calibrator are then measured simultaneously within dialysates and drug C_{tissue} are estimated from corresponding measured C_{out} after correction using the calibrator recovery by loss values.

However, the major problem remaining with MD is that some compounds do not present the proper physico-chemical characteristics for being good candidates. Numerous studies have been conducted and published with fluoroquinolones or β -lactam antibiotics, but MD is much more challenging with non-water-soluble substances, because an aqueous perfusate is commonly used^{36,37} and also because lipophilic compounds may bind to the probe and tubing components³⁸. As an example, problems have been encountered with colistin, which sticks on MD membranes³⁹.

Therefore MD is a delicate technique for which experimental factors appear to be critical with respect to the validity of the results. In general MD probe introduction induces no or minimal tissue damage and the risk of infection is very limited. Its recognition as a reliable and advantageous technique has been reinforced over time as demonstrated by its use in various areas ^{36,40}. Regulatory agencies such as the FDA also recommended MD for investigating tissue drug distribution, especially since this is a minimally invasive procedure that allows the measurement of free extracellular drug concentrations at the site of action ⁴¹. Therefore the obtained profiles should be more predictive of the outcome than traditional plasma PK, provided they are properly interpreted ⁴²⁻⁴⁴.

How to interpret antibiotics tissue concentrations obtained by microdialysis?

Many factors determining antibiotics distribution in tissues may be altered in critically ill patients, including change in protein binding ^{45,46} or pH, as well as fluid shifts ⁴⁵. Blood flow may also be altered depending on the organs, and alteration of antibiotics PK in critically ill patients with sepsis or septic shock has been described ⁴⁷.

However as for any other drug, antibiotic tissue distribution follows a number of basic rules ⁴⁸. It is therefore important not only to report descriptive data but also to compare those with theory in order to avoid misinterpretations. This important issue will be illustrated by MD distribution studies conducted with imipenem and meropenem, two carbapenem antibiotics characterized by a small volume of distribution, consistent with their distribution restricted to extracellular body fluids. And because MD may be conducted in various tissues or body fluids, it offers a unique opportunity to challenge basic PK concepts such as factors governing tissue drug distribution.

From a theoretical standpoint, if simple bi-directional passive diffusion occurs, which is the case with most tissues and in particular the muscle, unbound drug concentrations at equilibrium should be equal in blood and tissues ISF ⁴⁸. However in a MD study published in 2002, Tegeder et al. described that imipenem distribution in muscle and subcutaneous tissue was reduced in critically ill patients compared with healthy volunteers ³⁰. Impaired tissue perfusion in patients was proposed as an explanation for imipenem reduced tissue distribution.

However this explanation does not fit with basic pharmacokinetic concepts. Distinction has to be made between the rate and extent of distribution. In some but not all circumstances, tissue perfusion may have an effect on the rate of drug distribution. This is the case when trans-membrane diffusion is rapid and the distribution rate is limited by the blood flow. But when trans-membrane diffusion is slow, the distribution rate is limited by the permeability and blood flow has no effect on it. In any case, tissue blood flow should not have an effect on the extent of distribution, because if the antibiotic distribution from blood to tissue ISF is delayed due to reduced blood flow, the redistribution, that is the back distribution from tissue to blood, will also be delayed for the same reason. In other words it would take longer for the antibiotic to get in but also longer to get out and overall tissue exposure, that is the extent of distribution should not be altered. Furthermore according to basic pharmacokinetic concepts, if drug distribution occurs simply by passive diffusion, the unbound concentrations at equilibrium should be equal in plasma and tissue ISF, and therefore corresponding total unbound AUCs after single dose administration in plasma and tissue ISF should also be equal. Yet the theory also predicts two situations leading to lower unbound ISF tissue than plasma AUCs. One is when an efflux transport systems interplays with tissue distribution as well described at the blood-brain barrier and the other is when drug degradation occurs within tissues. These basic concepts may be better understood using equations ⁴⁸ and taking imipenem as an illustration. Drugs may distribute among the plasma volume (V_p), the ISF without the plasma volume (V_E), and the remainder of the body water volume (V_R). Because imipenem does not penetrate within cells, V_R may be assumed to be negligible and imipenem volume of distribution should correspond to the extracellular space ($V_p + V_E$), consistent with the value reported in the literature. By definition, at equilibrium, the rates of imipenem transfer from plasma to tissue ECF ($R_{P \rightarrow T}$) and from tissue to plasma ($R_{T \rightarrow P}$) are identical and respectively equal to:

$$R_{P \rightarrow T} = CL_{P \rightarrow T} * C_{U,P} \quad (\text{Eq. I.1})$$

and

$$R_{T \rightarrow P} = CL_{T \rightarrow P} * C_{U,T} \quad (\text{Eq. I.2})$$

where $CL_{P \rightarrow T}$ and $CL_{T \rightarrow P}$ correspond to the distributional clearance from plasma to tissue and from tissue to plasma respectively, and $C_{U,P}$ and $C_{U,T}$ to the unbound drug concentrations in plasma and tissue. In case of passive diffusion, the distributional clearances $CL_{P \rightarrow T}$ and $CL_{T \rightarrow P}$ have to be equal. The combination of Eq. 1 and 2 shows that $C_{U,P}$ and $C_{U,T}$ should be equal. Using the same reasoning and after integration with time, it can be shown that the

corresponding area under the concentration versus time curves following a single dose should also be equal ($AUC_{U,P} = AUC_{U,T}$). Actually, this is what we observed ²⁸, and not only plasma and tissue AUCs were identical in healthy volunteers but also in critically ill patients (**Figure I.2**). The discrepancy between these results consistent with theory and those of Tegeder et al. can very likely be explained by an artefact due to an erroneous correction for recovery ^{28,30}. These authors used a recovery value estimated at 68.8% *in vitro*, which should not be done since these values are known to overestimate *in vivo* recoveries. In fact the mean *in vivo* recovery estimated during our study was close to 36.5% (range: 27.1% and 47.3%) and noticeably using this value Tegeder et al. would have obtained results virtually similar to ours.

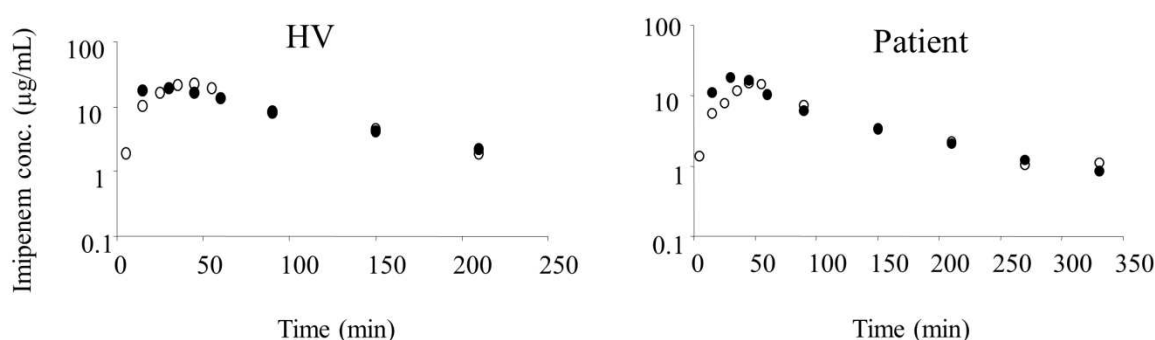


Figure I.2: Individual unbound imipenem plasma (●) and muscle (○) concentrations versus time in a healthy volunteer (*Left*) and in a representative critically ill patient (*Right*) after a single 30-min intravenous infusion of 500 mg of imipenem administered as a fixed combination of imipenem and cilastatin (Tienam®) (adapted from Dahyot et al., 2008 ²⁸).

Another important point is that because it takes time for antibiotics to get into tissues, ISF concentrations versus time curves should always be shifted to the right compared with corresponding plasma concentrations versus time profiles. In case of rapid distribution this shift may be difficult to observe, especially because of the time resolution issue with MD. However distribution may be rapid in healthy volunteers and delayed in critically ill patients due to impaired blood flow. Again the difference may be negligible as was the case with imipenem ²⁸, but it may also be more important and if partial AUCs ($AUC_{0-\tau}$) are considered instead of total AUCs ($AUC_{0-\infty}$), one may conclude that the extent of distribution is impaired when it is only delayed. The same comment applies to antibiotics with slow tissue (and therefore longer) distribution. In this situation, if dialysate collection is not long enough the estimated partial ISF-to-plasma AUC ratios are likely to be less than unity whereas in fact

they should be equal to one. The effect of reduced distribution rate related to impaired tissue perfusion was investigated from simulations conducted with a semi-physiological PK model after completing a MD muscle distribution study of amoxicillin in rats ⁴⁹ and is illustrated in **Figure I.3**.

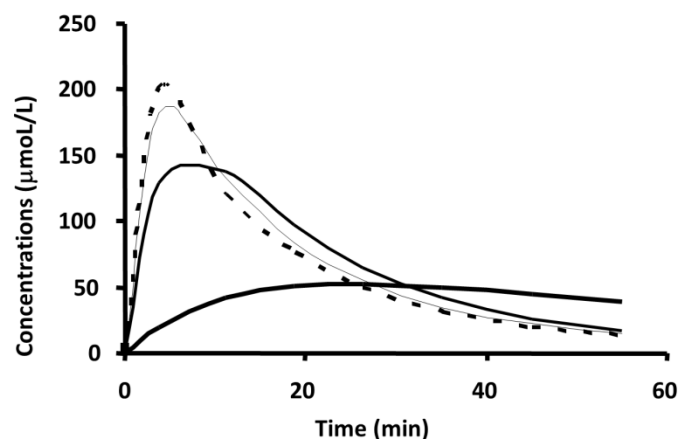


Figure I.3: Medians of amoxicillin concentration-time profiles at early times in muscle extracellular fluid obtained using a semi-physiological PK model after 1000 simulations with different values of muscle blood flow : i.e., the physiological value (dashed line), -80% (thin solid line), 90% (medium solid line) and -99% (thick solid line) of the physiological value (adapted from Marchand et al., 2005 ⁴⁹).

A different scenario should be observed when active efflux transport systems restrict tissue distribution, such as in brain ⁵⁰. Then the rate of drug transfer from tissue to plasma becomes:

$$R_{T \rightarrow P} = (CL_{T \rightarrow P} + CL_{\text{efflux}}) C_{U,T} \quad (\text{Eq. I.3})$$

where CL_{efflux} stands for the distributional clearance due to the efflux transport systems.

By combining Eq. 1 and 3 and after reorganization it appears that:

$$C_{U,T} / C_{U,P} = CL_{P \rightarrow T} / (CL_{T \rightarrow P} + CL_{\text{efflux}}) \quad (\text{Eq. I.4})$$

Therefore: $C_{U,T} / C_{U,P} = AUC_{U,T} / AUC_{U,P} < 1$.

This situation was nicely illustrated with data obtained in neurocritical care patients treated by meropenem ⁵¹ or cefotaxime ³⁵. Unbound brain AUCs were considerably lower than corresponding plasma AUCs (**Figure I.4**), consistent with the fact that meropenem and cefotaxime are likely to be substrates of efflux transporters such as organic anion transporter 3

(OAT-3), peptide transporter 2 (PEPT-2) or multidrug resistant associated protein 4 (MRP4)⁵²⁻⁵⁴. By contrast brain and plasma AUCs were virtually identical for metronidazole, an antibiotic with no reported affinity for efflux transport systems at the blood brain barrier⁵⁵.

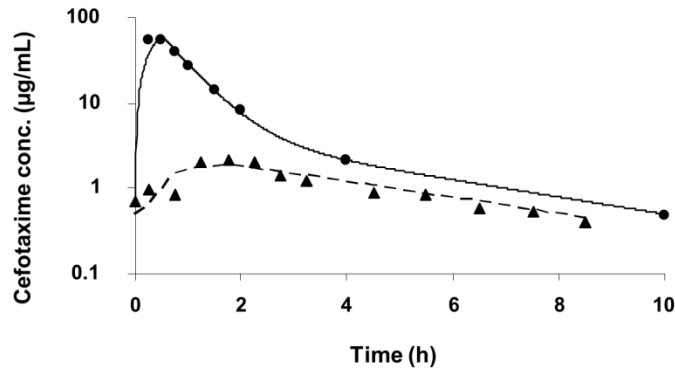


Figure I.4: Individual plasma and brain cefotaxime concentrations versus time in a representative neurocare patient between two consecutive 30-min intravenous infusions of 2 g of cefotaxime every 8 hours: Dots (●) represent experimental unbound concentrations in plasma, and triangles (▲) correspond to experimental unbound concentrations in brain ISF measured by microdialysis. Full and dashed lines represent respectively estimated concentrations in plasma and in brain ISF by the pharmacokinetic model. (adapted from Dahyot-Fizelier, 2013³⁵).

The last scenario corresponds to the situation in which drug degradation occurs within tissue. Then the rate of drug transfer from tissue to plasma would become:

$$R_{T \rightarrow P} = (CL_{T \rightarrow P} + CL_{\text{degrad}}) C_{U,T} \quad (\text{Eq. I.5})$$

where CL_{degrad} represents tissue degradation.

The consequences on the AUC ratios would then be the same as above. This scenario was again illustrated with meropenem³² and then confirmed with imipenem (**Figure I.5**)³⁴. Carbapenems in general are relatively unstable and a relatively rapid degradation was observed in fresh peritoneal fluid obtained from patients with peritonitis and spiked with imipenem³⁴. As a consequence of this peripheral degradation a fraction of the antibiotic that distributed in the peritoneal fluid could not return in the systemic circulation accounting for lower AUC in the peritoneal fluid than in plasma (**Figure I.4**).

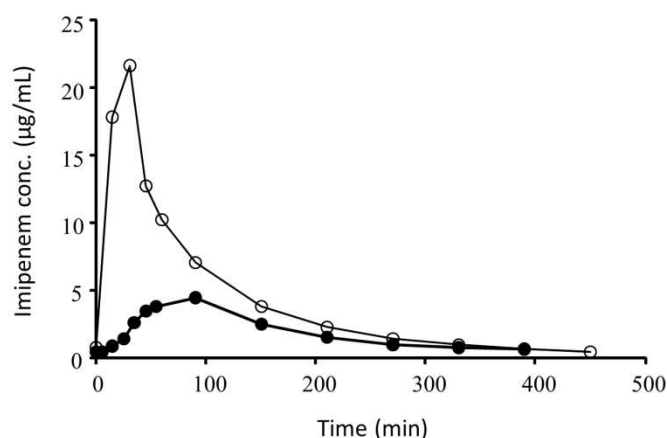


Figure I.5: Time course of imipenem in plasma and peritoneal fluid in a representative patient after an intravenous dose of 500 mg infused over 30 min. Open (o) and closed (●) symbols represent measured unbound concentrations in plasma and peritoneal fluid, respectively (adapted from Dahyot-Fizelier, 2010³⁴).

How to link antibiotics tissue concentrations with pharmacodynamic effect?

Understanding antibiotics PK is necessary but not sufficient for dosing regimen optimization. This also requires information on antibiotics pharmacodynamics (PD), which is traditionally provided by the minimal inhibitory concentration (MIC), from which susceptibility breakpoints are defined by comparing the antibiotic concentration to the MIC. However except for antibiotics delivered by continuous infusion at steady-state, antibiotics concentrations within the body vary with time, whereas MIC is a static concentration. Antibiotics concentrations may be several folds higher than MIC during several hours and then become lower for the rest of the dosing interval, which is difficult to interpret in terms of efficacy. Therefore even if MIC is the most popular parameter to predict antibiotics efficacy, it presents major limitations related to both PK and PD. In order to overcome this difficulty PK parameters have been combined to MIC to generate PK-PD indexes such as free time above the MIC ($t > \text{MIC}$) that relates to the time that the unbound antibiotic concentration remains above the MIC; free maximum concentration above the MIC ($C_{\text{max}}/\text{MIC}$), or free area under the curve above the MIC (AUC/MIC), corresponding to the ratio of the area under the curve over 24 hours and the MIC value⁴³. For some antibiotics such as β -lactams, the antimicrobial effect is related to $t > \text{MIC}$, meaning that their unbound concentrations should be

kept above MIC for a sufficient length of time. A common target is 40% of the time between two consecutive doses⁵⁶. These antibiotics are often referred to as time-dependent antibiotics. For other antibiotics such as aminoglycosides, the antimicrobial effect is related to C_{max}/MIC, meaning that their unbound peak concentration should be sufficiently high compared with MIC. Typically a 10 fold ratio between C_{max} and MIC is considered as necessary for antimicrobial efficacy and constitutes the usual target. These antibiotics are often referred to as concentration-dependent antibiotics⁵⁷. Finally for fluoroquinolones the effect is best correlated with AUC/MIC⁵⁷. Noticeably these empirical PK/PD indexes have been validated experimentally *in vivo* most often using the mouse thigh infection model, and although they represent crude approximations of a much more complex reality, they have been extremely useful to define the modern dosing regimen strategies for antibiotics.

Once a target has been defined the probability of target attainment may be estimated using Monte Carlo simulations, which is becoming very popular⁵⁸. Usually these simulations rely on antibiotic plasma concentrations, but it would make more sense to combine antibiotics tissue concentrations profiles obtained by MD with PK-PD targets to predict the probability of target attainment at the infection site, which we did in our previously mentioned MD studies with imipenem and/or meropenem³² and³⁴.

A different approach is to link the antimicrobial effect (PD) characterized *in vitro*, with for example bacterial kill curves, with the antibiotic free concentration versus time profile at the infection site (PK) determined by MD. Simulations of the antimicrobial effect may then be done for various dosing regimens using a PK-PD model^{44,59}. In this sense, by combining the advantage of the dynamic quantification of the free drug at the infection site, MD constitutes a useful sampling tool to establish the PK-PD parameters of antibiotics⁴¹. The real potential advantage of this approach compared with the previous one is that it would allow taking into consideration complex PD behaviors such as in the presence of an adaptation phenomenon, which cannot be reflected by MIC and therefore by traditional PK-PD indexes based on MIC. However characterizing PD *in vitro* with semi-mechanistic models does not consider extra-complexities occurring *in vivo* such as host defense in particular.

In conclusion, various validated methodologies exist for the characterization of tissue distribution of antibiotics. Although not always the most appropriate approach, depending on the tissue or organ, and not always feasible, MD is state of the art. But efforts should be conducted to develop and validate modern PK-PD models to characterize and predict not only antibiotics concentrations versus time profiles at the site of effect, but also their effect time course.

REFERENCES

1. Ryan DM 1993. Pharmacokinetics of antibiotics in natural and experimental superficial compartments in animals and humans. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 31 Suppl D:1-16.
2. EMEA 2000. Points to consider on pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antibacterial medicinal products. (www.emea.eu.int/pdfs/human/ewp/265599en.pdf).
3. FDA 1998. Guidance for Industry. Developing antimicrobial drugs - general considerations for clinical trials. (www.fda.gov/cder/guidance/2580dftp.pdf).
4. Kearney BP, Aweeka FT 1999. The penetration of anti-infectives into the central nervous system. *Neurologic clinics* 17(4):883-900.
5. Zeitlinger M, Muller M, Joukhadar C 2005. Lung microdialysis--a powerful tool for the determination of exogenous and endogenous compounds in the lower respiratory tract (mini-review). *The AAPS journal* 7(3):E600-608.
6. Zhanel GG, Dueck M, Hoban DJ, Vercaigne LM, Embil JM, Gin AS, Karlowisky JA 2001. Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. *Drugs* 61(4):443-498.
7. Muller M, Haag O, Burgdorff T, Georgopoulos A, Weninger W, Jansen B, Stanek G, Pehamberger H, Agneter E, Eichler HG 1996. Characterization of peripheral-compartment kinetics of antibiotics by in vivo microdialysis in humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40(12):2703-2709.
8. Kunin CM, Craig WA, Kornguth M, Monson R 1973. Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 226:214-224.
9. Brunner M, Hollenstein U, Delacher S, Jager D, Schmid R, Lackner E, Georgopoulos A, Eichler HG, Muller M 1999. Distribution and antimicrobial activity of ciprofloxacin in human soft tissues. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43(5):1307-1309.
10. Ryan DM, Cars O, Hoffstedt B 1986. The use of antibiotic serum levels to predict concentrations in tissues. *Scandinavian journal of infectious diseases* 18(5):381-388.
11. Muller M, dela Pena A, Derendorf H 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: distribution in tissue. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48(5):1441-1453.
12. Mouton JW, Theuretzbacher U, Craig WA, Tulkens PM, Derendorf H, Cars O 2008. Tissue concentrations: do we ever learn? *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 61(2):235-237.
13. Fischman AJ, Alpert NM, Babich JW, Rubin RH 1997. The role of positron emission tomography in pharmacokinetic analysis. *Drug metabolism reviews* 29(4):923-956.
14. Pien HH, Fischman AJ, Thrall JH, Sorensen AG 2005. Using imaging biomarkers to accelerate drug development and clinical trials. *Drug discovery today* 10(4):259-266.

15. Korting HC, Schafer-Korting M, Maass L, Klesel N, Mutschler E 1987. Cefodizime in serum and skin blister fluid after single intravenous and intramuscular doses in healthy volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31(11):1822-1825.
16. Brunner M, Schmiedberger A, Schmid R, Jager D, Piegler E, Eichler HG, Muller M 1998. Direct assessment of peripheral pharmacokinetics in humans: comparison between cantharides blister fluid sampling, in vivo microdialysis and saliva sampling. *British journal of clinical pharmacology* 46(5):425-431.
17. Philip-Joet F, Bruguerolle B, Reynaud M, Arnaud A 1992. Correlations between theophylline concentrations in plasma, erythrocytes and cantharides-induced blister fluid and peak expiratory flow in asthma patients. *European journal of clinical pharmacology* 43(5):563-565.
18. Stahle L, Arner P, Ungerstedt U 1991. Drug distribution studies with microdialysis. III: Extracellular concentration of caffeine in adipose tissue in man. *Life sciences* 49(24):1853-1858.
19. Ungerstedt U, Pycock C 1974. Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften* 30(1-3):44-55.
20. Lonnroth P, Jansson PA, Smith U 1987. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *The American journal of physiology* 253(2 Pt 1):E228-231.
21. de Lange EC, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD 1997. Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain research Brain research reviews* 25(1):27-49.
22. de Lange EC, de Boer AG, Breimer DD 2000. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Advanced drug delivery reviews* 45(2-3):125-148.
23. Mindermann T, Zimmerli W, Gratzl O 1998. Rifampin concentrations in various compartments of the human brain: a novel method for determining drug levels in the cerebral extracellular space. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42(10):2626-2629.
24. Olson RJ, Justice JB, Jr. 1993. Quantitative microdialysis under transient conditions. *Analytical chemistry* 65(8):1017-1022.
25. de Lange EC, Marchand S, van den Berg D, van der Sandt IC, de Boer AG, Delon A, Bouquet S, Couet W 2000. In vitro and in vivo investigations on fluoroquinolones; effects of the P-glycoprotein efflux transporter on brain distribution of sparfloxacin. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 12(2):85-93.
26. Bouw MR, Hammarlund-Udenaes M 1998. Methodological aspects of the use of a calibrator in in vivo microdialysis-further development of the retrodialysis method. *Pharmaceutical research* 15(11):1673-1679.
27. Marchand S, Chenel M, Lamarche I, Pariat C, Couet W 2003. Dose ranging pharmacokinetics and brain distribution of norfloxacin using microdialysis in rats. *Journal of pharmaceutical sciences* 92(12):2458-2465.

28. Dahyot C, Marchand S, Bodin M, Debeane B, Mimoz O, Couet W 2008. Application of basic pharmacokinetic concepts to analysis of microdialysis data: illustration with imipenem muscle distribution. *Clinical pharmacokinetics* 47(3):181-189.
29. Marchand S, Dahyot C, Lamarche I, Mimoz O, Couet W 2005. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of noninfected rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(6):2356-2361.
30. Tegeder I, Schmidtke A, Brautigam L, Kirschbaum A, Geisslinger G, Lotsch J 2002. Tissue distribution of imipenem in critically ill patients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 71(5):325-333.
31. Herkner H, Muller MR, Kreischitz N, Mayer BX, Frossard M, Joukhar C, Klein N, Lackner E, Muller M 2002. Closed-chest microdialysis to measure antibiotic penetration into human lung tissue. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165(2):273-276.
32. Karjagin J, Lefevre S, Oselin K, Kipper K, Marchand S, Tikkerberi A, Starkopf J, Couet W, Sawchuk RJ 2008. Pharmacokinetics of meropenem determined by microdialysis in the peritoneal fluid of patients with severe peritonitis associated with septic shock. *Clin Pharmacol Ther* 83(3):452-459.
33. Chenel M, Marchand S, Dupuis A, Lamarche I, Paquereau J, Pariat C, Couet W 2004. Simultaneous central nervous system distribution and pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the electroencephalogram effect of norfloxacin administered at a convulsant dose in rats. *British journal of pharmacology* 142(2):323-330.
34. Dahyot-Fizelier C, Lefevre S, Laksiri L, Marchand S, Sawchuk RJ, Couet W, Mimoz O 2010. Kinetics of imipenem distribution into the peritoneal fluid of patients with severe peritonitis studied by microdialysis. *Clin Pharmacokinet* 49(5):323-334.
35. Dahyot-Fizelier C, Frasca D, Gregoire N, Adier C, Mimoz O, Debaene B, Couet W, Marchand S 2013. Microdialysis study of cefotaxime cerebral distribution in patients with acute brain injury. *Antimicrob Agents Chemother* 57(6):2738-2742.
36. Brunner M, Derendorf H 2006. Clinical microdialysis: Current applications and potential use in drug development. *Trends in Analytical Chemistry* 25(7):674-680.
37. Chaurasia CS 1999. In vivo microdialysis sampling: theory and applications. *Biomedical chromatography : BMC* 13(5):317-332.
38. Li Y, Peris J, Zhong L, Derendorf H 2006. Microdialysis as a Tool in Local Pharmacodynamics. *The AAPS Journal* 08(02):1-33.
39. Matzneller P, Gobin P, Lackner E, Zeitlinger M 2015. Feasibility of microdialysis for determination of protein binding and target site pharmacokinetics of colistin in vivo. *Journal of clinical pharmacology* 55(4):431-437.
40. Li Y, Peris J, Zhong L, Derendorf H 2006. Microdialysis as a tool in local pharmacodynamics. *The AAPS journal* 8(2):E222-235.
41. Schmidt S, Banks R, Kumar V, Rand KH, Derendorf H 2008. Clinical microdialysis in skin and soft tissues: an update. *Journal of clinical pharmacology* 48(3):351-364.

42. Brunner M, Langer O 2006. Microdialysis versus other techniques for the clinical assessment of in vivo tissue drug distribution. *The AAPS journal* 8(2):E263-271.
43. Sahre M, Naik R, Derendorf H. 2011. Applications of Microdialysis in Skin and Soft Tissues. In Tsai T-H, editor *Applications of Microdialysis in Pharmaceutical Sciences*, First ed.: Wiley. p 584.
44. Muller M, dela Pena A, Derendorf H 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: distribution in tissue. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5):1441-1453.
45. Gonzalez D, Conrado DJ, Theuretzbacher U, Derendorf H 2011. The effect of critical illness on drug distribution. *Current pharmaceutical biotechnology* 12(12):2030-2036.
46. Craig WA, Suh B 1978. Changes in protein binding during disease. *Scandinavian journal of infectious diseases Supplementum* (14):239-244.
47. Roberts JA, Lipman J 2009. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Critical care medicine* 37(3):840-851; quiz 859.
48. Rowland M, Tozer TM. 2011. *Clinical pharmacokinetics: concepts and applications*, 4th ed.: Wolters Kluwer Heath/Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, Pa.
49. Marchand S, Chenel M, Lamarche I, Couet W 2005. Pharmacokinetic modeling of free amoxicillin concentrations in rat muscle extracellular fluids determined by microdialysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(9):3702-3706.
50. Hammarlund-Udenaes M, Paalzow LK, de Lange EC 1997. Drug equilibration across the blood-brain barrier--pharmacokinetic considerations based on the microdialysis method. *Pharmaceutical research* 14(2):128-134.
51. Dahyot-Fizelier C, Timofeev I, Marchand S, Hutchinson P, Debaene B, Menon D, Mimoz O, Gupta A, Couet W 2010. Brain microdialysis study of meropenem in two patients with acute brain injury. *Antimicrob Agents Chemother* 54(8):3502-3504.
52. Akanuma S, Uchida Y, Ohtsuki S, Kamiie J, Tachikawa M, Terasaki T, Hosoya K 2011. Molecular-weight-dependent, anionic-substrate-preferential transport of beta-lactam antibiotics via multidrug resistance-associated protein 4. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 26(6):602-611.
53. Spector R 2010. Nature and consequences of mammalian brain and CSF efflux transporters: four decades of progress. *Journal of neurochemistry* 112(1):13-23.
54. Shen H, Ocheltree SM, Hu Y, Keep RF, Smith DE 2007. Impact of genetic knockout of PEPT2 on cefadroxil pharmacokinetics, renal tubular reabsorption, and brain penetration in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35(7):1209-1216.
55. Frasca D, Dahyot-Fizelier C, Adier C, Mimoz O, Debaene B, Couet W, Marchand S 2014. Metronidazole and hydroxymetronidazole central nervous system distribution: 1. microdialysis assessment of brain extracellular fluid concentrations in patients with acute brain injury. *Antimicrob Agents Chemother* 58(2):1019-1023.

56. Schmidt S, Rock K, Sahre M, Burkhardt O, Brunner M, Lobmeyer MT, Derendorf H 2008. Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52(11):3994-4000.
57. Adembri C, Novelli A 2009. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of antimicrobials: potential for providing dosing regimens that are less vulnerable to resistance. *Clinical pharmacokinetics* 48(8):517-528.
58. Bradley JS, Garonzik SM, Forrest A, Bhavnani SM 2010. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and Monte Carlo simulation: selecting the best antimicrobial dose to treat an infection. *The Pediatric infectious disease journal* 29(11):1043-1046.
59. Brunner M, Derendorf H, Muller M 2005. Microdialysis for in vivo pharmacokinetic/pharmacodynamic characterization of anti-infective drugs. *Current opinion in pharmacology* 5(5):495-499.

4. PHARMACOCINETIQUE/PHARMACODYNAMIE DES ANTIBIOTIQUES

Le contrôle des concentrations libres d'antibiotiques au niveau du site infectieux est nécessaire mais pas suffisant pour déterminer l'efficacité d'un traitement. Cela nécessite également une bonne compréhension de la pharmacodynamie (PD) décrivant la relation concentration-effet et donc la sensibilité de la bactérie au traitement. Différentes approches sont utilisées pour étudier la relation pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) des antibiotiques dans le but d'optimiser le schéma posologique et maximiser l'effet bactéricide tout en limitant la toxicité. Ces approches seront présentées dans ce chapitre en distinguant le cas où un antibiotique est administré seul des cas où il est associé soit à un autre antibiotique soit à une molécule non-antibiotique comme un inhibiteur de β -lactamases.

4.1. PK/PD des antibiotiques en monothérapie

4.1.1. Concentration minimale inhibitrice

Pendant de nombreuses années, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été le paramètre majeur pour déterminer la sensibilité bactérienne à un antibiotique. La méthode de référence pour déterminer la CMI d'un antibiotique est la méthode des dilutions qui consiste à exposer un inoculum bactérien (en général, 5×10^5 unités formant colonie (UFC) / mL) à une gamme de concentrations d'antibiotique, obtenue en réalisant des dilutions au demi, durant une période d'incubation de 16-20 h (156). La CMI est alors définie comme la plus faible concentration d'antibiotique qui, dans ces conditions, inhibe toute culture visible de la souche bactérienne.

La CMI est un paramètre relativement simple à déterminer et qui est donc adapté à une utilisation en routine. Cependant, une des limites de cette approche est qu'il s'agit d'un paramètre statique évalué seulement à un instant donné et qui ne permet donc pas de caractériser l'efficacité d'un antibiotique lorsque ses concentrations changent au cours du temps (157). Pour faire face à cette difficulté, des indices PK/PD ont été considérés.

4.1.2. Indices PK/PD

Les travaux menés par Eagle *et al.* dans les années 1940-1950 ont démontré que la détermination de la CMI ne permettait pas à elle seule de décrire correctement l'activité des antibiotiques *in vivo* et que la PK de ces molécules devait être prise en compte (158-161). L'étude des relations PK/PD des antibiotiques a conduit à la définition de trois indices basés sur trois paramètres PK différents et sur la CMI de la bactérie (162, 163). Ces indices ont permis de distinguer les antibiotiques temps-dépendant, comme les β -lactamines, dont l'efficacité est liée au temps pendant lequel les concentrations libres sont supérieures à la CMI ($fT > CMI$), des antibiotiques concentration-dépendant, comme les quinolones et les aminoglycosides, dont l'efficacité dépend de la concentration libre maximale atteinte (fC_{max}/CMI). Une troisième catégorie d'antibiotiques, incluant les macrolides et les tétracyclines, dont l'efficacité est liée au rapport de l'aire sous la courbe des concentrations libres en fonction du temps sur la CMI ($fAUC/CMI$) a également été décrite. La détermination de ces indices PK/PD est devenue l'approche de référence pour évaluer la PK/PD des antibiotiques et pour guider la sélection de schémas posologiques optimaux. Ainsi, si la relation dépend du temps, la stratégie sera de maintenir les concentrations libres d'antibiotique au-dessus de la CMI le plus longtemps possible, tandis que si l'efficacité dépend de la concentration, l'objectif sera d'atteindre une concentration libre maximale suffisamment élevée par rapport à la CMI.

La détermination de l'indice PK/PD corrélé à l'efficacité antimicrobienne repose le plus souvent sur des modèles animaux (162-165). Typiquement, des souris rendues neutropéniques sont infectées avec un certain inoculum bactérien dans la cuisse ou le poumon. Le traitement est alors initié et des prélèvements sanguins sont effectués afin de déterminer les concentrations d'antibiotiques et calculer les différents paramètres PK/PD ($fT > CMI$, fC_{max}/CMI et $fAUC/CMI$) pour chaque animal. De plus, à la fin de l'expérience (après 24 h, généralement), le nombre total de bactéries est déterminé pour chaque organe infecté. En utilisant différentes doses et intervalles de dose dans des études dites de fractionnement de doses, il est alors possible d'évaluer la relation entre chaque indice PK/PD et la réponse bactérienne. L'indice PK/PD, caractérisant le mieux l'action d'un antibiotique sur une bactérie, est déterminé en ajustant un modèle Emax sigmoïde (**Équation 1**) à la densité bactérienne mesurée à un instant donné et représentée en fonction de la valeur de

chacun des 3 indices PK/PD (**Figure 17**) (166). L'indice pour lequel le coefficient de détermination (r^2) est le plus élevé est alors sélectionné.

$$E = E_0 - \frac{PD_{max} \times X^\gamma}{EC_{50}^\gamma + X^\gamma}$$

(Équation 1)

Où E est la densité bactérienne à un temps donné (exprimée par exemple en $\log_{10}$ UFC/mL), E_0 est la densité bactérienne à ce temps en absence d'antibiotique, X est un des 3 indices PK/PD définis ci-dessus, PD_{max} représente l'effet maximal obtenu lorsque l'augmentation de l'exposition n'entraîne plus de destruction bactérienne, EC_{50} est la valeur de X nécessaire pour atteindre 50% de PD_{max} et γ est le paramètre de sigmoïdité.

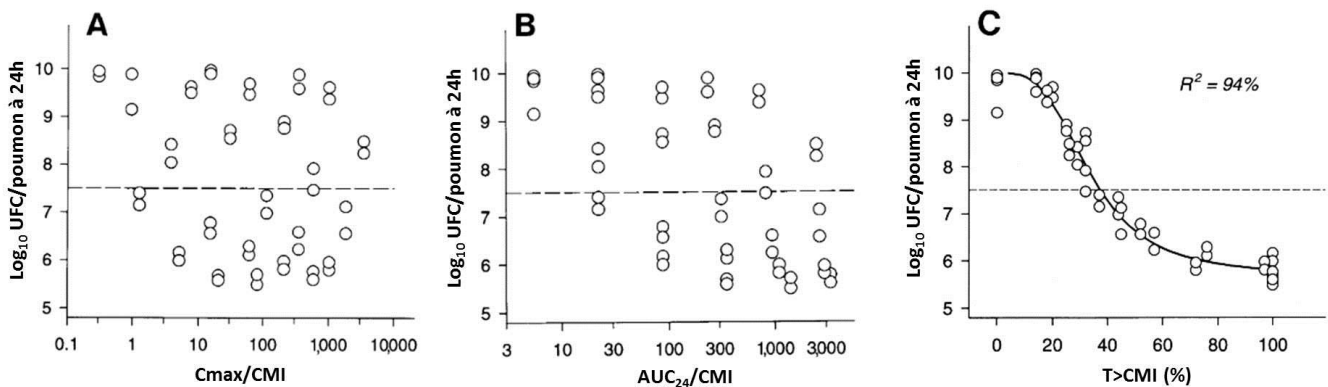


Figure 17. Relation entre trois indices PK/PD (A, rapport de la concentration maximale (Cmax) sur la CMI ; B, rapport de l'aire sous la courbe à 24 h (AUC₂₄) sur la CMI ; C, pourcentage du temps pendant lequel les concentrations plasmatiques sont supérieures à la CMI) et le nombre de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816 dans les poumons de souris neutropéniques après 24 h de traitement avec la céfotaxime. Chaque cercle représente une observation pour une souris et la ligne en pointillés indique le nombre de bactéries au début du traitement. Dans la figure C, la ligne représente l'ajustement d'une fonction Emax sigmoïde avec le coefficient de détermination (R^2) correspondant à la part de la variance du nombre de bactéries à 24 h expliquée par la régression (d'après Craig WA, 1998 (162)).

Une fois que le meilleur indice PK/PD pour un antibiotique a été déterminé, la cible PD à atteindre afin de produire l'effet bactéricide désiré est définie (par exemple, $T > CMI > 60\%$). La cible PD correspond à la valeur minimale de l'indice PK/PD qui est visée lors du traitement des patients. Ensuite, pour évaluer la probabilité d'atteindre la cible PD (PTA, *probability of target attainment*), 1000 à 10000 profils PK individuels sont simulés en

utilisant un modèle PK de population développé à partir de données cliniques (167-169). La PTA est alors définie, pour chaque schéma posologique testé, comme la proportion de sujets simulés dont la valeur de l'indice PK/PD est supérieure à la cible PD. La PTA est souvent représentée en fonction de la distribution des valeurs de CMI observées en clinique pour la souche considérée (**Figure 18**). Le niveau de PTA considéré comme acceptable pour assurer une forte probabilité de succès thérapeutique est sujet à débat mais en général des valeurs de 99, 95 ou 90% sont utilisées (169).

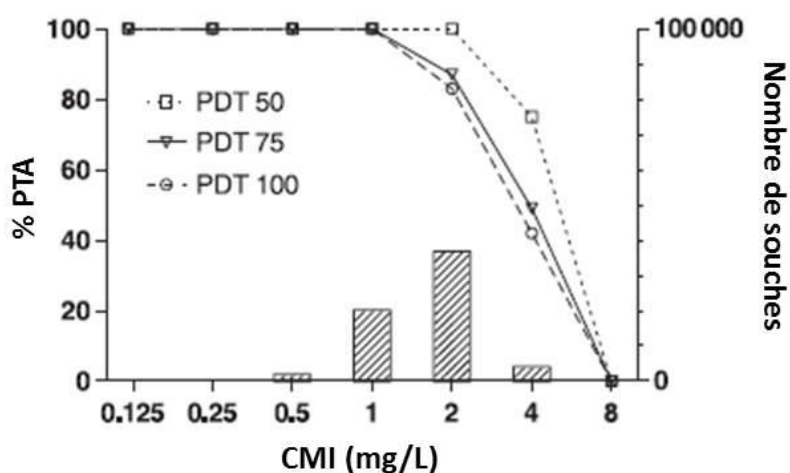


Figure 18. Probabilité d'atteindre la cible PD (PTA) du linézolide pour une gamme de CMIs et pour 3 différentes cibles (PDT) : $AUC_{0-24}/CMI > 50, 75$ et 100 , montrant une tendance à la diminution de la PTA quand la CMI augmente. Les barres représentent la distribution de la CMI pour des souches sauvages de *Staphylococcus aureus* (d'après Mouton JW et al., 2012 (169)).

Bien que l'évaluation des indices PK/PD soit recommandée par les agences réglementaires pour déterminer un schéma posologique optimal (170), cette approche présente quelques limites. Tout d'abord, les indices PK/PD reposent sur la CMI et, par conséquent, les inconvénients décrits ci-dessus concernant la CMI s'appliquent également à cette approche qui ne permet pas de caractériser l'évolution de l'effet au cours du temps. De plus, il est fait l'hypothèse que la CMI restait constante pendant toute la période de traitement. Or, les bactéries exposées à des concentrations d'antibiotique insuffisantes pour les éliminer totalement, sont susceptibles de s'adapter et de développer des résistances se traduisant par une repousse des bactéries après une décroissance initiale, et suggérant une variation de l'effet au cours du temps (171).

4.1.3. Modélisation PK/PD semi-mécanistiques

4.1.3.1. Etude de cinétique de bactéricidie

Divers systèmes expérimentaux *in vitro* ont été développés pour compléter les études *in vivo* lors de la caractérisation de la PK/PD des antibiotiques (172). Les études *in vitro* sont généralement plus faciles à réaliser, moins coûteuses et permettent une plus grande flexibilité dans la conception de l'étude que les alternatives *in vivo*. Dans les études de cinétique de bactéricidie *in vitro*, un inoculum bactérien de départ est exposé à un antibiotique et le nombre de bactéries est évalué au cours du temps. Ce type d'étude a été utilisé comme base pour développer les modèles PK/PD dans le but de décrire la dynamique des populations bactériennes, les effets des antibiotiques et l'émergence de résistance (166, 173). Selon l'objectif de l'étude, les concentrations d'antibiotique utilisées peuvent être constantes (étude statique) ou varier de façon à mimer la demi-vie de l'antibiotique chez le patient (étude dynamique). Les données provenant d'études statiques sont souvent utilisées pour développer le modèle mathématique reliant les concentrations libres d'antibiotique à la réponse bactérienne, tandis que les données provenant d'études dynamiques sont utilisées pour valider le modèle et prédire l'effet en clinique (166, 173).

Les systèmes statiques représentent les systèmes expérimentaux *in vitro* les plus simples pour caractériser la PK/PD des antibiotiques. Ils consistent en tubes contenant du milieu de culture, des bactéries et l'antibiotique à une concentration fixe (174). Les tubes sont incubés à 35-37°C et des échantillons sont prélevés de façon répétée pendant la période d'incubation afin de quantifier à la fois le nombre de bactéries (UFC) et la concentration d'antibiotique (pour s'assurer de sa stabilité tout au long de l'expérience). De par la simplicité de ces études, un grand nombre d'expériences peuvent être réalisées permettant ainsi de tester les effets d'une large gamme de concentrations. Par conséquent, les données provenant des études statiques forment souvent les connaissances fondamentales concernant la relation entre l'exposition à l'antibiotique et l'efficacité. Toutefois, l'éventuelle dégradation des antibiotiques au cours de l'expérience, comme par exemple les β -lactamines qui sont dégradées par les β -lactamases, devra être prise en compte lors de l'analyse des résultats (cf. Article IV)

Les systèmes dynamiques sont généralement plus compliqués à mettre en place et plus coûteux que les systèmes statiques mais permettent d'évaluer les relations PK/PD en simulant *in vitro* l'évolution au cours du temps des concentrations libres d'antibiotique au site d'action en fonction d'une demi-vie prédéfinie (172). Différents systèmes plus ou moins sophistiqués ont été développés, tous dans le but de simuler les profils PK observés *in vivo*. Dans les modèles de dilution, du milieu de culture frais sans antibiotique est ajouté de façon continue ou intermittente au compartiment contenant l'antibiotique et les bactéries, faisant ainsi varier les concentrations d'antibiotique (175, 176). Pour éviter la perte et la dilution simultanée des bactéries, un filtre est placé à la sortie du compartiment de culture (177), ce qui peut néanmoins entraîner des problèmes de colmatage limitant la durée de l'expérimentation. Les modèles de dialyse ou de diffusion sont constitués quant à eux de deux compartiments, un compartiment central et un compartiment périphérique, séparés par une membrane ou des fibres creuses (*hollow fibers*) (**Figure 19**) (178-181). Comme dans les modèles de dilution, du milieu frais est ajouté au compartiment central contenant l'antibiotique afin de diminuer sa concentration. L'antibiotique doit alors diffuser à travers la membrane pour atteindre et exercer son effet sur les bactéries qui se trouvent dans le compartiment périphérique. Avec ces systèmes dynamiques, différents schémas posologiques, différentes demi-vies d'élimination et même différents inocula bactériens peuvent être simulés pour étudier leurs effets sur la dynamique des populations bactériennes sur une période de temps donnée, par exemple 24, 48 h ou même plusieurs semaines (182). Cependant, bien que ce type d'études vise à reproduire les concentrations observées en clinique et donc à prédire l'effet attendu chez les patients, les conditions dans lesquelles sont réalisées ces expériences sont différentes de celles rencontrées *in vivo* expliquant la difficulté des extrapolations *in vitro-in vivo* (cet aspect sera commenté plus en détail par la suite dans la partie Discussion).

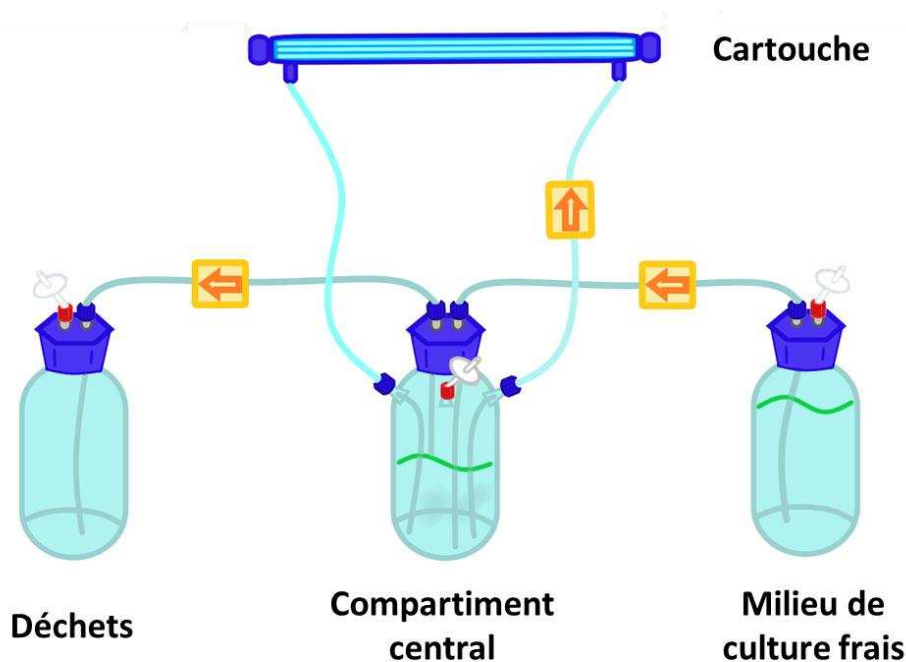


Figure 19. Représentation schématique du modèle d'infection *hollow fibers*.

4.1.3.2. Structure générale des modèles PK/PD des antibiotiques

Dans le domaine de l'antibiothérapie, les modèles PK/PD permettent de décrire les caractéristiques générales de croissance bactérienne, l'effet de l'antibiotique ainsi que le développement des résistances bactériennes (183). Mais comme les données collectées pour développer le modèle permettent rarement de décrire en détail le mécanisme d'action de l'antibiotique sur les bactéries, le modèle est dit « semi-mécanistique ». En règle générale, le modèle se compose d'un sous-modèle caractérisant la croissance et la mort naturelle des bactéries en fonction du temps (modèle bactérien), d'un sous-modèle caractérisant les concentrations de l'antibiotique en fonction du temps (modèle PK) et enfin de l'interaction entre ces deux sous-modèles formant le modèle complet (modèle PK/PD). Typiquement, le modèle bactérien consiste en plusieurs compartiments, chacun représentant différentes sous-populations de bactéries en fonction de leur sensibilité au traitement (166). Les bactéries peuvent se multiplier dans le système jusqu'à ce qu'un nombre maximum de bactéries soit atteint. L'effet antimicrobien peut être défini soit par une stimulation de la mort bactérienne, soit par une inhibition de la croissance bactérienne et dépend de la concentration en antibiotique. Il est généralement décrit par un modèle Emax ou Emax-sigmoïde (**Équation 2**).

Des modèles similaires ont également été utilisés pour caractériser l'activité d'antifongiques (184).

$$E = \frac{E_{max} \times C^\gamma}{C^\gamma + EC_{50}^\gamma}$$

(Équation 2)

Où C est la concentration en antibiotique, E_{max} est l'effet maximum de l'antibiotique, EC_{50} est la concentration produisant 50% de E_{max} et γ est le paramètre de sigmoïdité qui caractérise la « sensibilité » de la relation concentration-effet.

Une fois que le modèle a été développé et que les paramètres ont été estimés, des simulations peuvent être réalisées afin de prédire l'effet de scénarios non testés, comme par exemple différents schémas posologiques, sur la mort bactérienne au cours du temps, et ainsi contribuer à la détermination de la posologie optimale d'un antibiotique ou la conception de futures études *in vitro* et *in vivo*. Il a notamment été démontré que les modèles semi-mécanistiques PK/PD développés à partir de données *in vitro* avaient la capacité d'identifier les indices PK/PD de plusieurs antibiotiques et l'ampleur de ces indices nécessaires à un effet *in vivo* (157, 185). De plus, il a été conclu que, par rapport aux approches classiques pour la détermination des indices PK/PD, les approches de modélisation permettaient de considérer les différences PK qui peuvent exister entre les individus de différentes sous-populations.

4.2. PK/PD des associations d'antibiotiques

Ces dernières décennies, l'utilisation d'associations d'antibiotiques a nettement augmenté afin d'élargir le spectre antimicrobien ou d'augmenter l'efficacité antibactérienne en empêchant l'émergence de résistance (186). L'effet de l'association dépend du profil PK de chaque agent antimicrobien, de la cible de chacun des agents et du mécanisme d'interaction entre les deux agents en plus de leurs propriétés pharmacologiques intrinsèques. Additivité, synergie et antagonisme sont les principaux termes utilisés pour décrire les interactions entre agents antimicrobiens (187). L'additivité suppose que l'effet observé d'une association correspond à celui attendu, étant donné ce que l'on sait des effets de chaque molécule

individuellement. A partir de là, les notions de synergie et antagonisme sont définies. Quand l'effet observé d'une association est plus important que prévu, l'association est qualifiée de synergique, tandis que lorsque l'effet est moins important que prévu l'association est dite antagoniste.

4.2.1. Approche des *checkerboard*

La synergie entre deux molécules est très souvent déterminée en utilisant la méthode des *checkerboard* (188, 189). Dans des microplaques 96 puits, des dilutions au demi de chaque antibiotique sont réalisées, horizontalement pour l'un et verticalement pour l'autre, permettant ainsi d'étudier un grand nombre de combinaisons de concentrations simultanément. Un inoculum bactérien est ensuite ajouté dans chaque puit et, après incubation pendant 16-20 h, la turbidité de chaque puit est évaluée visuellement. Les résultats peuvent être interprétés en traçant un isobologramme, graphique permettant d'évaluer de façon qualitative l'interaction entre les deux antibiotiques associés et de distinguer les associations synergiques des associations antagonistes (190). Une approche plus quantitative consiste à déterminer l'indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire (FIC) calculé en comparant la CMI de chaque antibiotique seul (CMI_A et CMI_B) avec la CMI de chaque antibiotique en association ($CMI_{A/B}$ et $CMI_{B/A}$) (191) (**Équation 3**).

$$FIC = \frac{MIC_{A/B}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B/A}}{MIC_B}$$

(**Équation 3**)

La valeur de l'indice FIC est ensuite utilisée pour catégoriser l'interaction entre les deux antibiotiques étudiés : la combinaison est considérée comme synergique quand $FIC \leq 0.5$, additive quand $0.5 < FIC < 1$ et antagoniste quand $FIC > 4$. Par conséquent, l'indice FIC ne permet que de conclure quant à la nature de l'interaction entre deux antibiotiques mais ne permet pas de quantifier cette interaction ni d'évaluer l'effet combiné des deux molécules sur la destruction bactérienne au cours du temps. Or, la synergie n'est pas la seule chose à considérer. Deux antibiotiques faiblement actifs peuvent être hautement synergiques ce qui ne signifie pas que leur association sera recommandée en clinique, contrairement à deux

molécules hautement efficaces mais seulement additives. De plus, bien que la technique des *checkerboard* et la détermination de l'indice FIC semblent simples, des conclusions complètement différentes peuvent être faites en ce qui concerne la nature de l'interaction entre deux antibiotiques suivant la méthode utilisée pour interpréter les résultats (192).

4.2.2. Indices PK/PD lors d'associations d'antibiotiques

Les indices et les cibles PK/PD ont été largement utilisés et avec succès pendant de nombreuses années pour définir les schémas posologiques appropriés des antibiotiques, mais pas dans le contexte des associations d'antibiotiques, alors qu'en pratique plusieurs antibiotiques différents sont presque toujours associés pour le traitement d'infections nosocomiales sévères, laissant d'importantes questions sans réponse (193). A titre d'exemple, quelles seraient les cibles PD d'une association de deux antibiotiques concentration-dépendant dont les cibles correspondent au ratio $C_{max}/CMI > 8$ pour chacun d'eux lorsqu'ils sont administrés séparément ? En clinique, la sélection du schéma posologique pour une combinaison est souvent empirique et est basée sur le schéma posologique optimal de chaque antibiotique administré séparément. Mais il n'y a pas de réel rationnel scientifique et très peu de données expérimentales pour soutenir cette pratique.

Une seule étude a été réalisée afin d'évaluer si les mêmes indices PD qui expliquent l'efficacité d'antibiotiques en monothérapie expliqueraient l'efficacité pendant une thérapie combinée dans un modèle d'infection de la cuisse de souris neutropéniques (194). Les résultats de cette étude ont suggéré que l'efficacité d'une association pouvait être prédite par la combinaison des réponses de chacun des agents administrés séparément en fonction de leur indice PD respectif. Par exemple, si un certain schéma posologique d'un antibiotique entraîne un pourcentage de $T > CMI$ qui produit une diminution de $1 \log_{10}$ du nombre de colonies après 24 h et qu'un schéma posologique d'un deuxième antibiotique conduit à un ratio AUC/MIC qui produit également une diminution de $1 \log_{10}$ du nombre de colonies après 24 h, alors l'effet attendu lorsque ces deux antibiotiques sont associés serait une diminution de $2 \log_{10}$ du nombre de colonies après 24 h. Dans ce modèle, deux antibiotiques montrent une synergie si le point d'intersection de la droite de régression des réponses prédites et observées est significativement différent de 0. La méthode utilisée dans cette étude est, ainsi, une autre façon de définir la synergie entre deux antibiotiques. Elle a l'avantage, par rapport à l'indice

FIC, de tenir compte de la PK des deux antibiotiques associés et d'être basée sur des résultats *in vivo*. Toutefois, un des principaux inconvénients de cette méthode est le travail et le nombre d'animaux qu'elle implique. De plus, elle se heurte aux limites des modèles d'additivité des effets antimicrobiens (**Annexe 1**). Par conséquent, cette approche traditionnelle pour déterminer un schéma posologique est difficilement applicable dans le cas des associations d'antibiotiques.

4.2.3. Modélisation PK/PD semi-mécanistique

La caractérisation PK/PD et la capacité à évaluer les interactions entre les agents antimicrobiens associés constituent un réel défi. Les indices PK/PD traditionnels ne pouvant être appliqués directement et l'exploration de toutes les combinaisons de dose possibles étant irréalisables, les modèles PK/PD semi-mécanistiques qui tiennent compte des profils de concentrations en fonction du temps et de leur interaction sur la croissance et la mort bactérienne au cours du temps s'avèrent être alors des outils essentiels pour identifier des schémas posologiques appropriés pour les associations d'agents antimicrobiens (183, 195). Comme pour les antibiotiques en monothérapie, les modèles PK/PD sont le plus souvent développés à partir de données provenant d'études de cinétique de bactéricidie *in vitro* réalisées avec des concentrations constantes d'antibiotiques (196). Les expériences avec des concentrations variables, mimant les profils PK observés *in vivo* et en clinique, sont encore plus informatives mais prennent aussi plus de temps et généralement seulement un faible nombre de combinaisons peuvent être testées. Les données provenant de tels systèmes dynamiques sont alors utilisées pour valider le modèle PK/PD et étudier les effets de différents schémas posologiques.

Dans le cas des associations d'antibiotiques, la relation PK/PD peut être décrite de différentes manières. Selon l'association étudiée, il est possible que les deux molécules aient différents modes d'action avec un des antibiotiques inhibant la croissance bactérienne tandis que l'autre stimule la mort bactérienne (**Figure 20a**). C'est le cas, par exemple, de l'association du linézolide, qui est connu pour inhiber la synthèse protéique des bactéries, avec le méropénème (197) ou la nisine (198) qui ont un effet bactéricide. Mais ces deux études ont conclu que les associations avec le linézolide étaient inférieures aux autres associations étudiées (méropénème + vancomycine et nisine + amikacine).

Quand les molécules utilisées en association stimulent toutes les deux la mort bactérienne, différentes approches peuvent être appliquées. Dans le cas le plus simple, la molécule A n'affecte pas l'effet bactéricide de la molécule B et vice versa. Les effets sont alors indépendants. La molécule A va donc tuer les bactéries qui sont moins sensibles à B et inversement (**Figure 20b**). Par exemple, une sous-population d'*A. baumannii* peut être sensible à l'imipénème mais résistante aux aminoglycosides et vice versa pour la seconde sous-population (199). Ce type d'approche est appelée synergie des sous-populations. Dans des situations plus complexes, un deuxième type de synergie dite mécanistique est défini et se traduit par une augmentation de la mort d'une sous-population bactérienne due à la présence simultanée de deux agents antimicrobiens (198). Ce type de synergie peut être identifié si une sous-population de bactéries est plus rapidement tuée par l'association des molécules A et B que par les effets indépendants des deux molécules en monothérapie. Par exemple, la molécule B, en plus d'avoir sa propre activité, peut potentialiser l'effet de la molécule A associée (**Figure 20c**). Une telle interaction entre deux agents antimicrobiens peut être considérée aussi bien pour une sous-population spécifique que pour toutes les sous-populations de bactéries. On peut citer comme exemples, ceux du doripénème et des aminoglycosides qui augmentent l'efficacité ou la puissance de la polymyxine B et de l'imipénème, respectivement (200, 201). Enfin, lorsque les deux molécules associées sont actives sur la même sous-population, il est possible aussi qu'elles interagissent entre elles et que chacune potentialise l'effet de l'autre (**Figure 20d**). Ce dernier type de synergie a été décrit, par exemple, pour les associations vertilmicine-ceftazidime (202) et méropénème-vancomycine (197) dans des modèles plus complexes.

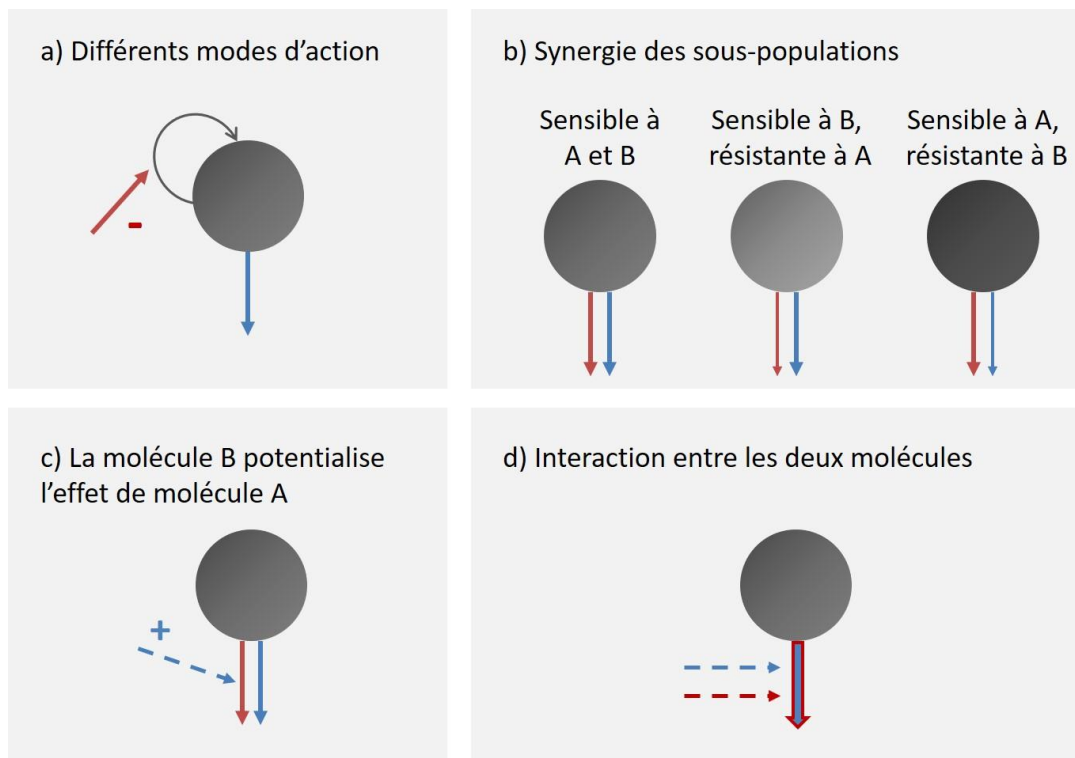


Figure 20. Modèles d'interaction PK/PD permettant d'évaluer l'effet combiné de deux agents antimicrobiens (A et B). Les flèches en trait plein représentent les effets antibactériens des molécules A (rouge) et B (bleue), et les flèches en pointillés représentent une synergie de type mécanistique entre les deux molécules (d'après Brill MJE, 2017 (196)).

Tous les modèles d'interaction qui viennent d'être décrits peuvent être utilisés seuls, ou être combinés pour décrire la relation PK/PD des associations testées contre diverses souches bactériennes.

Il y a différentes façons d'additionner les vitesses de destruction bactérienne due à chaque molécule associée pour obtenir l'effet antibactérien combiné. Les différentes fonctions utilisées pour caractériser l'interaction PD entre des agents antimicrobiens en association sont présentées en **Annexe 1**.

4.3. PK/PD des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases

4.3.1. Approche des *checkerboard*

Les associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases représentent un cas particulier des associations d'antibiotiques pour lesquelles l'interprétation des *checkerboard* est différente. En effet, les inhibiteurs de β -lactamases n'étant pas caractérisés par une valeur de CMI, comme en règle générale ils n'ont qu'une très faible activité bactéricide intrinsèque, voire aucune, l'indice FIC ne peut pas être déterminé. Une nouvelle approche visant à caractériser l'augmentation d'efficacité de la β -lactamine par l'inhibiteur de β -lactamases est présentée par la suite, dans la partie Travaux personnels (Article III).

4.3.2. Indices PK/PD lors des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases

Dans le cas des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases, les indices PK/PD et les cibles PD à atteindre sont généralement évalués dans des modèles d'infection *in vitro* dynamiques de type *hollow fibers* (HF) (87, 203-207). Le protocole de détermination des indices PK/PD pour ce type d'association varie d'une étude à l'autre mais est toujours basé sur des études de fractionnement de doses. Et l'indice ainsi que la cible PK/PD pour chaque composé sont déterminés en présence d'une concentration/dose fixe de l'autre agent. Cette méthode sera plus largement explicitée et commentée par la suite dans la partie Discussion en prenant l'exemple de l'association ATM-AVI.

La relation entre le nombre de colonies à 24 h et les différents indices PK/PD est évaluée, comme pour les antibiotiques, en ajustant un modèle de régression aux données de l'étude. Cependant, les indices PK/PD classiques basés sur la CMI ne peuvent pas être utilisés dans le cas des inhibiteurs de β -lactamases. Des indices tels que fC_{max} , $fAUC$ et $fT > C_T$ sont utilisés à la place, où C_T a été définie comme la concentration seuil inhibitrice en dessous de laquelle l'inhibition des β -lactamases est insuffisante pour prévenir la croissance bactérienne en présence de β -lactamine (208). Différentes concentrations seuil sont en général

testées et celle présentant la meilleure corrélation avec l'efficacité est choisie comme valeur finale. Une fois le meilleur indice PK/PD déterminé, la cible PD à atteindre afin de produire l'effet bactéricide désiré est définie.

Des études de fractionnement de dose ont également été réalisées *in vivo*, dans des modèles d'infection de la cuisse ou du poumon de la souris neutropénique, afin de déterminer l'indice PK/PD d'inhibiteurs de β -lactamases (92, 209) ou valider la cible PK/PD définie lors des études HF (204).

Pour sélectionner le schéma posologique des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases adapté au traitement des patients en clinique, des analyses de PTA sont réalisées comme décrit précédemment (210-212). Des simulations de Monte Carlo sont effectuées en se basant sur les données PK/PD pré-cliniques disponibles pour l'association étudiée et sur les analyses PK de population menées chez des patients ou des volontaires sains. Les cibles des deux molécules associées doivent être atteintes simultanément pour conclure au succès du traitement.

4.3.3. Modélisation PK/PD semi-mécanistique

Tout comme pour les associations d'antibiotiques, l'interaction PD entre les β -lactamines et les inhibiteurs de β -lactamases peut être étudiée en utilisant une approche de modélisation semi-mécanistique prenant en compte à la fois les activités antimicrobiennes des deux molécules en association, la dégradation de la β -lactamine par les β -lactamases et l'inhibition de sa dégradation par l'inhibiteur de β -lactamases (**Figure 21**) (213). La même structure de modèle ainsi que le même type de fonctions d'interaction (**Annexe 1**) sont utilisés dans ce contexte.

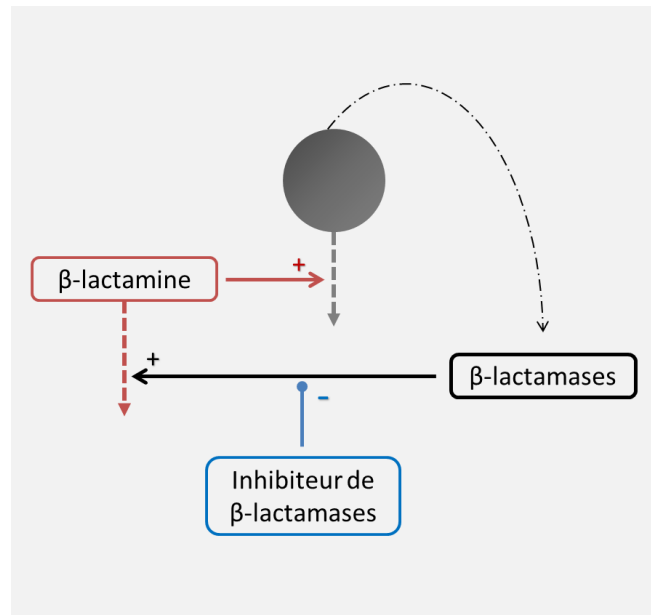


Figure 21. Représentation schématique des modèles PK/PD utilisés pour caractériser l'effet antimicrobien des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases.

Des modèles caractérisant l'effet des associations ATM-AVI (214) et ceftazidime-AVI (215) sur différentes souches d'*Enterobacteriaceae* et *P. aeruginosa* ont récemment été développés à partir de données d'études *in vitro* réalisées avec des concentrations statiques puis validés avec des systèmes *in vitro* dynamiques ou des modèles *in vivo*. Ces modèles seront largement repris et discutés par la suite.

OBJECTIFS DE LA THESE

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet COMBACTE-CARE, consortium public-privé européen dont le but est de combattre la résistance aux carbapénèmes en participant au développement de l'association ATM-AVI qui constitue une nouvelle option de traitement pour les patients atteints d'infections sévères, telles que les infections intra-abdominales compliquées, dues à des pathogènes à Gram négatif produisant des MBLs.

L'objectif général de cette thèse était alors d'évaluer la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de l'association ATM-AVI afin d'aider à la détermination de schémas posologiques adéquats pour le traitement d'infections à ERC.

Les objectifs spécifiques étaient :

- Evaluer la distribution de l'ATM et de l'AVI dans le liquide intra-péritonéal de rats sains et infectés (péritonite) par microdialyse, et comparer les concentrations libres tissulaires avec les concentrations libres sanguines (PK *in vivo*).
- Explorer et modéliser l'effet antimicrobien *in vitro* de différentes concentrations d'ATM et d'AVI seuls et en association (PK/PD *in vitro*) contre différentes souches d'*Enterobacteriaceae* multi-résistantes présentant divers profils de β -lactamases, en utilisant deux types d'approche :
 - Une approche mathématique simple visant à décrire et comparer, l'effet de l'AVI sur la CMI de l'ATM parmi les différentes souches d'*Enterobacteriaceae* testées, lors d'études préliminaires de *screening* (*checkerboard*).
 - Une approche de modélisation semi-mécanistique plus sophistiquée capable de décrire la réponse bactérienne à l'association ATM-AVI au cours du temps (courbes de bactéricidie), la dégradation de l'ATM par les β -lactamases ainsi que la prévention de cette dégradation par l'AVI dans le but d'explorer les effets respectifs de l'ATM et de l'AVI ainsi que l'interaction PD entre ces deux molécules.

TRAVAUX PERSONNELS

Article II :

Microdialysis Study of Aztreonam-Avibactam Distribution in Peritoneal Fluid and Muscle of Rats with or without Experimental Peritonitis

Alexia Chauzy¹, Isabelle Lamarche¹, Christophe Adier^{1,2}, William Couet^{1,2}, Sandrine
Marchand^{1,2}

¹ INSERM, U1070, UFR de Médecine Pharmacie, Université de Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France

² Laboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique, CHU of Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86000 Poitiers, France

Article publié dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2018)

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate aztreonam (ATM) and avibactam (AVI) distribution in intraperitoneal fluid and muscle interstitial fluid by microdialysis in rats, with or without peritonitis, and to compare the unbound concentrations in tissue with the unbound concentrations in blood. Microdialysis probes were inserted into the jugular vein, hind leg muscle and peritoneal cavity of control rats ($n = 5$) and rats with intra-abdominal sepsis ($n = 9$) induced by cecal ligation and punctures. ATM and AVI probe recoveries in each media were determined for both molecules in each rat by retrodialysis by drug. ATM-AVI combination was administered as an intravenous (IV) bolus at a dose of 100-25 mg·kg⁻¹. Microdialysis samples were collected over 120 min, and ATM-AVI concentrations were determined by LC-MS/MS. Non-compartmental pharmacokinetic analysis was conducted and non-parametric test were used for statistical comparisons between groups (infected versus control) and medium. ATM and AVI distribution in intraperitoneal fluid and muscle was rapid and complete both in control rats and in rats with peritonitis and concentration profiles in blood, intraperitoneal fluid and muscle were virtually superimposed, in control and infected animals, both for ATM and AVI. No statistically significant difference was observed between unbound tissue extracellular fluid (ECF) and systemic areas under the curve for both molecules in control and infected animals. In the present study, intraperitoneal infection induced by cecal ligation and puncture had no apparent effect on ATM and AVI pharmacokinetics in rats.

INTRODUCTION

Intra-abdominal infections are common and represent the second major reason (after lung infections) for septic shock in intensive care units (ICUs) (1). While surgery is the first-line treatment in the management of peritonitis, appropriate antimicrobial therapy, including the administration of a suitable molecule at an optimized dosing regimen, is also essential to prevent recurrent intra-abdominal infection, reduce surgical wound complications and control bacteremia (2, 3).

Pharmacokinetic studies of antibiotics most often rely on plasma data. However, since most infections occur in tissue ECF, unbound antibiotic concentrations in the interstitial fluid at the target site are more useful for predicting the antibacterial effect and optimal drug dosing regimens (4). Although in most tissue unbound drug concentrations at equilibrium should be equal in plasma and tissue ECF (5), some situations as the presence of efflux transporters or a peripheral degradation in tissue can lead to lower unbound tissue ECF than plasma areas under the curve (AUC) (6). Microdialysis is a well-known technique that can be used for determination of unbound drug concentrations including antibiotics in tissue interstitial fluid and which rapidly gained popularity in pharmacokinetic and pharmacodynamic studies, both in experimental animals and humans (7, 8).

Aztreonam-avibactam (ATM-AVI) is a novel β -lactam- β -lactamase inhibitor combination under development for the treatment of serious Gram-negative infections, including complicated intra-abdominal infections, proven or strongly suspected to be caused by multiple-drug resistant (MDR) pathogens producing metallo- β -lactamases (MBLs) (9). ATM-AVI combination provides broad coverage against *Enterobacteriaceae* strains that produce broad-spectrum β -lactamases (10) and which have been commonly reported to cause peritonitis (3, 11).

The objective of this study was to investigate ATM and AVI distribution within peritoneal fluid (PF) and muscle interstitial fluid by microdialysis and to compare intraperitoneal unbound concentrations with unbound concentrations in blood, in healthy rats and in rats with experimental peritonitis caused by cecal ligation and puncture.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Aztreonam (Azactam[®]; Sanofi-aventis Laboratories, Paris, France) and avibactam (provided as a dry powder by Astrazeneca, Macclesfield, United Kingdom) were used to prepare ATM-AVI solutions in 0.9% NaCl or Ringer solution for intravenous administration and probe perfusion, respectively. All chemicals used were of analytical grade.

Animals. Experiments were carried out in accordance with EC Directive 2010/63/EU. They were approved by the local ethics committee (COMETHEA) and registered by the French Ministry of Higher Education and Research (authorization number 2016011111381822). Fourteen male Sprague-Dawley rats from Charles Rivers Laboratories (Saint-Germain-Nuelles, France) weighing 291 ± 16 g (mean $\pm$ standard deviation) were used and divided into two groups, a peritonitis group ($n = 9$) and a control group ($n = 5$). All animals were acclimatized in ventilated rack in temperature regulated environment with a 12-h light-dark cycle, with also free access to food and water for a minimum of 5 days before the beginning of the experiment.

Surgery. (i) Catheter, vein and muscle probes insertion. The day before the experiment, rats received subcutaneous administration (SC) of buprenorphine at a dose of 0.05 mg.kg^{-1} before to be anesthetized by isoflurane (Forene; Abbot, Rungis, France) inhalation (3% in inhalation chamber followed by 1% under mask). Polyethylene cannula was then inserted into the left femoral vein for drug administration as previously described (25). Two CMA/20 probes (polycarbonate; cutoff, 20,000 Da; membrane length, 10 mm; CMA microdialysis; Phymep, Paris, France) were inserted into the right jugular vein and the right hind leg muscle as previously described too (25). In brief, the microdialysis CMA/20 probe, perfused with 1% low-molecular-weight heparin at a flow rate of $2 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ (CMA 100 microdialysis pump; Phymep, Paris, France), was inserted through the pectoral muscle into the right jugular vein with the help of an introducer (needle inserted into a tube) and then secured by suturing it to the pectoral muscle. The probe, perfused with Ringer solution (perfusion fluid T1 for peripheral tissue; CMA microdialysis; Phymep, Paris, France) was inserted into the right hind leg muscle as previously and finally secured by suturing it to the muscle. After insertion, the microdialysis probes were flushed at $10 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ for approximately 15 min to remove bubbles. The flow rate was then decreased to $2 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ until the end of the surgery. The inlet

and the outlet of probes as the femoral catheters were then passed subcutaneously to exit at the nape.

(ii) Induction of peritonitis. Directly after installation of vein catheter and muscle microdialysis probe, peritonitis was induced in rats of the infected group as previously described (31, 32). Briefly, after a laparotomy, the cecum was ligated just below the ileocecal valve, punctured three times below the ligature and kneaded to get the contents out before to be placed back into the peritoneal cavity. The abdomen was closed and at the end of surgery, rats were allowed to recover consciousness. Food was withdrawn approximately 12 h before the experiment, but animals had free access to water and at this time, they received a second SC injection of buprenorphine at the same dose as previously.

(iii) Intraperitoneal probe implantation. On the day of the experiment, the rats were re-anesthetized by isoflurane (Forene; Abbot, Rungis, France) inhalation. Another CMA/20 probe, perfused with Ringer solution (perfusion fluid T1 for peripheral tissue; CMA microdialysis; Phymep, Paris, France) was inserted into the rat peritoneal cavity between intestinal loops through laparotomy, as previously described (16). After insertion, the intraperitoneal microdialysis probe was flushed as previously done for the muscle probe. The probe was then sutured to the abdominal muscle, and the abdominal cavity was closed.

Pharmacokinetic study. (i) Recovery calculations. The pharmacokinetic experiment started with a retrodialysis by drug period, during which probes were perfused for 15 min at 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and then for 45 min at 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ with Ringer containing ATM-AVI (10-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) to equilibrate the system. After this equilibration period, microdialysate samples were collected for 1 h by fractions corresponding to 20-min intervals. To determine the *in vivo* recovery by loss ($\text{RL}_{in vivo}$), ATM and AVI concentrations in the perfusate (C_{in}) and in dialysates (C_{out}) were determined by LC-MS/MS. $\text{RL}_{in vivo}$ was expressed as a percentage and was calculated for each interval of time as follows:

$$\text{RL}_{in vivo} = [(C_{in} - C_{out})/C_{in}] \times 100 \quad (1)$$

The *in vivo* recovery used to correct the dialysate concentrations was the mean value obtained from the three individual determinations. A washout period of 1 h (15 min at 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and 45 min at 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) with blank Ringer solution perfusion was allowed before the

intravenous (IV) ATM-AVI administration to remove the ATM and AVI from the probes. The flow rate was maintained at $1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ for the rest of the study.

(ii) ATM-AVI administration. Aztreonam-avibactam combination was administered as an IV bolus at a dose of $100\text{-}25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

(iii) Microdialysis experiment. In each group, 10 min after the beginning of the IV ATM-AVI administration (which was time needed to flush the dead volume), the dialysates in muscle, peritoneal fluid (PF), and blood were collected automatically by a Univentor/820 microfraction collector (Phymep, Paris, France) over 120 min, at 10-min intervals. At the end of the experiment, two blood samples were collected via an intra-cardiac puncture, one in a tube containing fluoride and one in a heparinized tube, and then centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 min at 4°C . The supernatants were used for lactate and glucose determinations.

Microdialysis sample analysis. Analysis of ATM and AVI in the dialysates was performed by an adaptation of two separate LC-MS/MS methods, previously described and developed for the quantification of ceftazidime and avibactam in human plasma samples (36). Calibration curves were established in Ringer solution over $0.05\text{-}10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (AVI) and $0.1\text{-}200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (ATM). Directly after collection, microdialysates were diluted (1:3 [vol/vol]) with Ringer solution and were directly injected onto LC-MS/MS. The system included a Shimadzu high-performance liquid chromatography (HPLC) system module (Shimadzu Nexera XR, Marne la Vallée, France) coupled with an API 3000 mass spectrometer (Sciex, Les Ulis, France). ATM was analyzed on an XBridge C18 column ($3.5 \mu\text{m}$, 50 by 2.1 mm [inside diameter]; Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France). The mobile phase A consisted of water with 0.05% trifluoroacetic acid and mobile phase B was acetonitrile with 0.05% trifluoroacetic acid. The gradient for mobile phase B was set at 5%, 90% and 5% at 0.01, 1 and 3 minutes, respectively, with a flow rate of $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. AVI was analyzed on an Acquity BEH amide column ($1.7 \mu\text{m}$, 50 by 2.1 mm [inside diameter]; Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France), and a mobile phase composed of 100 mM ammonium formate and acetonitrile (5:95 [vol/vol]) was delivered isocratically at $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Electrospray ionization in negative mode was used for the detection of ATM and AVI. Ions were analyzed in the multiple reaction monitoring (MRM), and the following transitions were inspected: m/z 434.1 $\rightarrow$ 122 for ATM, m/z 440.1 $\rightarrow$ 122 for its deuterated internal standard and m/z 264.1 $\rightarrow$ 96 for AVI and m/z 270.1 $\rightarrow$ 96 for AVI labelled internal standard. Intraday variability was

characterized at four concentration levels (200, 5, 0.2, and 0.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for ATM; 10, 2, 0.1 and 0.05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for AVI) with a precision and bias of <10% for both compounds ($n = 5$ per molecule). Corresponding between-day variability was determined with a precision and a bias of <10% ($n=15$).

Glucose and lactate determinations. Glucose and lactate concentrations were measured respectively by enzymatic and colorimetric methods in Cobas 8000 device (Roche Diagnostics, Meylan, France). Glucose levels could be determined in only 11 out of 14 rats (2 control rats and 9 infected rats) due to technical issues.

Noncompartmental pharmacokinetic analysis. Pharmacokinetic parameters were determined in each individual rat by a noncompartmental approach according to standard procedures and with the software Phoenix WinNonLin 6.2 (Certara, Princeton, NJ, USA). Total unbound body clearance (CL_u) was calculated as $CL_u = \text{dose}/AUC_{u,\text{blood}}$, where $AUC_{u,\text{blood}}$ is the total area under the unbound blood concentration-versus-time curve from zero to infinity, calculated by trapezoidal rule. The area remaining under the curve after the last measured concentration, $C(\text{last})_{u,\text{blood}}$, was determined from $C(\text{last})_{u,\text{blood}}/k_{e,\text{blood}}$. The elimination rate constant ($k_{e,\text{blood}}$) and its corresponding half-life ($t_{1/2,\text{blood}}$) were estimated by least squares fit of the data points (log concentration-time) in the terminal phase of the decline. The volume of distribution (V_u) was obtained from $CL_u/k_{e,\text{blood}}$. The AUC and $t_{1/2}$ in tissues were also estimated by the same procedure and are referred as AUC_{muscle} , AUC_{PF} , $t_{1/2,\text{muscle}}$, and $t_{1/2,\text{PF}}$.

Statistical analysis. Concentrations were expressed as means $\pm$ SDs. However when probe recovery were lower than 10% in some tissues, concentrations were excluded from the analysis since small recovery values result in large errors in the estimation of the concentrations. Comparisons of AUC and $t_{1/2}$ estimated in blood, muscle and PF were performed for each group of rats by the nonparametric Kruskal-Wallis test. AUC, $t_{1/2}$, CL_u , V_u , $AUC_{\text{muscle}}/AUC_{u,\text{blood}}$ ratio, $AUC_{\text{PF}}/AUC_{u,\text{blood}}$ ratio, lactate and glucose concentrations between the two groups were compared by a Mann-Whitney test. Significance was set at a P level of <0.05.

RESULTS

Lactate and glucose concentrations in plasma. Lactate concentrations were significantly higher in rats with peritonitis than in control rats ($P < 0.05$), and were respectively equal to $4.30 \pm 0.89 \text{ mmol.L}^{-1}$ and $2.42 \pm 0.36 \text{ mmol.L}^{-1}$. Inversely, glucose concentrations were significantly lower in rats with peritonitis ($1.34 \pm 0.17 \text{ g.L}^{-1}$) than in control rats ($1.85 \pm 0.06 \text{ g.L}^{-1}$) ($P < 0.05$).

Pharmacokinetic study. ATM and AVI *in vivo* recovery by loss ($RL_{in vivo}$) differed between rats for the same medium and between different media for the same rat, but there was no trend between control and infected rats. However, probe recoveries were generally lower for ATM than for AVI. Therefore, whatever the group, the relative $RL_{in vivo}$ of ATM varied between $11.2 \pm 1.9 \%$ and $46.2 \pm 0.9 \%$ in blood, between $14.4 \pm 2.8 \%$ and $52.2 \pm 1.1 \%$ in muscle, and between $17.3 \pm 1.1 \%$ and $50.2 \pm 5.8 \%$ in PF. AVI probe recoveries varied between $27.3 \pm 1.6 \%$ and $66.8 \pm 1.5 \%$ in blood, between $25.6 \pm 1.5 \%$ and $53.5 \pm 1.6 \%$ in muscle, and between 26.1 ± 0.4 and $69.6 \pm 1.0 \%$ in PF.

(i) Control group. ATM and AVI blood, muscle, and PF concentrations measured in all rats included in the control group were used for the pharmacokinetic analysis. In these three media, the decay of unbound concentrations with time was monoexponential (**Fig. II.1b** and **II.2b**), and the concentration profiles were almost superimposed for ATM as well as AVI (**Fig. II.1a** and **II.2a**). Unbound peak concentrations in muscle and PF were observed within the first 10-minute collection interval and were not delayed compared with the unbound peak concentrations in blood. Pharmacokinetic parameter values obtained in the control group are presented in **Table II.1** for ATM and **Table II.2** for AVI. Half-lives and AUCs of ATM and AVI were not statistically different between blood, muscle and PF, and AUC ratios were close to 1 (**Tables II.1** and **II.2**).

(ii) Peritonitis group. ATM and AVI concentrations measured in all animals were kept for the pharmacokinetic analysis, except for ATM muscle concentrations in one infected rat in which ATM probe recovery in muscle was very low ($< 10\%$). The decay of unbound ATM and AVI concentrations in blood, muscle, and PF with time was still monoexponential (**Fig. II.1d** and **II.2d**), and the concentration versus time profiles in these three media were also virtually superimposed for both molecules with no delay when compared peak concentrations in

muscle and PF with peak concentrations in blood (**Fig. II.1c** and **II.2c**). Greater between-rat variability was observed in infected animals than in control rats (**Fig. II.1a** and **II.1c**, and **Fig. II.2a** and **II.2c**). Pharmacokinetic parameters values obtained in the control and peritonitis groups (**Tables II.1** and **II.2**) were not significantly different. Half-lives and AUCs were not statistically different between blood, muscle, and PF, with AUC ratios still being close to 1.

Table II.1. ATM unbound pharmacokinetic parameters values estimated in blood, muscle and PF of control rats and rats with peritonitis after an IV-bolus of ATM-AVI combination at a dose of 100-25 mg.kg⁻¹.

Parameter	Control rats			Rats with peritonitis		
	Blood	Muscle	Intraperitoneal fluid	Blood	Muscle	Intraperitoneal fluid
V_u (mL.kg ⁻¹)	473 ± 75			503 ± 328		
CL _u (mL.min ⁻¹ .kg ⁻¹)	12.8 ± 1.8			11.7 ± 7.9		
$t_{1/2}$ (min)	25.8 ± 4.7	26.4 ± 7.1	33.2 ± 10.3	30.2 ± 2.9	30.8 ± 5.6	31.0 ± 4.1
AUC (µg.min.mL ⁻¹)	7,907 ± 1,008	7,421 ± 451	6,972 ± 1,120	10,834 ± 4,475	10,193 ± 3,866	9,037 ± 3,939
AUC _{tissue} /AUC _{u,blood}		0.95 ± 0.12	0.89 ± 0.14		1.00 ± 0.30	0.92 ± 0.41

Table II.2. AVI unbound pharmacokinetic parameters values estimated in blood, muscle and PF of control rats and rats with peritonitis after an IV-bolus of ATM-AVI combination at a dose of 100-25 mg.kg⁻¹.

Parameter	Control rats			Rats with peritonitis		
	Blood	Muscle	Intraperitoneal fluid	Blood	Muscle	Intraperitoneal fluid
V_u (mL.kg ⁻¹)	285 ± 43			312 ± 40		
CL _u (mL.min ⁻¹ .kg ⁻¹)	10.6 ± 1.0			10.2 ± 1.2		
$t_{1/2}$ (min)	18.8 ± 2.9	18.1 ± 2.9	21.4 ± 5.0	21.4 ± 3.0	22.4 ± 4.7	22.8 ± 4.4
AUC (µg.min.mL ⁻¹)	2,382 ± 210	2,154 ± 293	2,107 ± 374	2,486 ± 339	2,523 ± 496	2,328 ± 600
AUC _{tissue} /AUC _{u,blood}		0.91 ± 0.11	0.88 ± 0.11		1.01 ± 0.14	0.94 ± 0.21

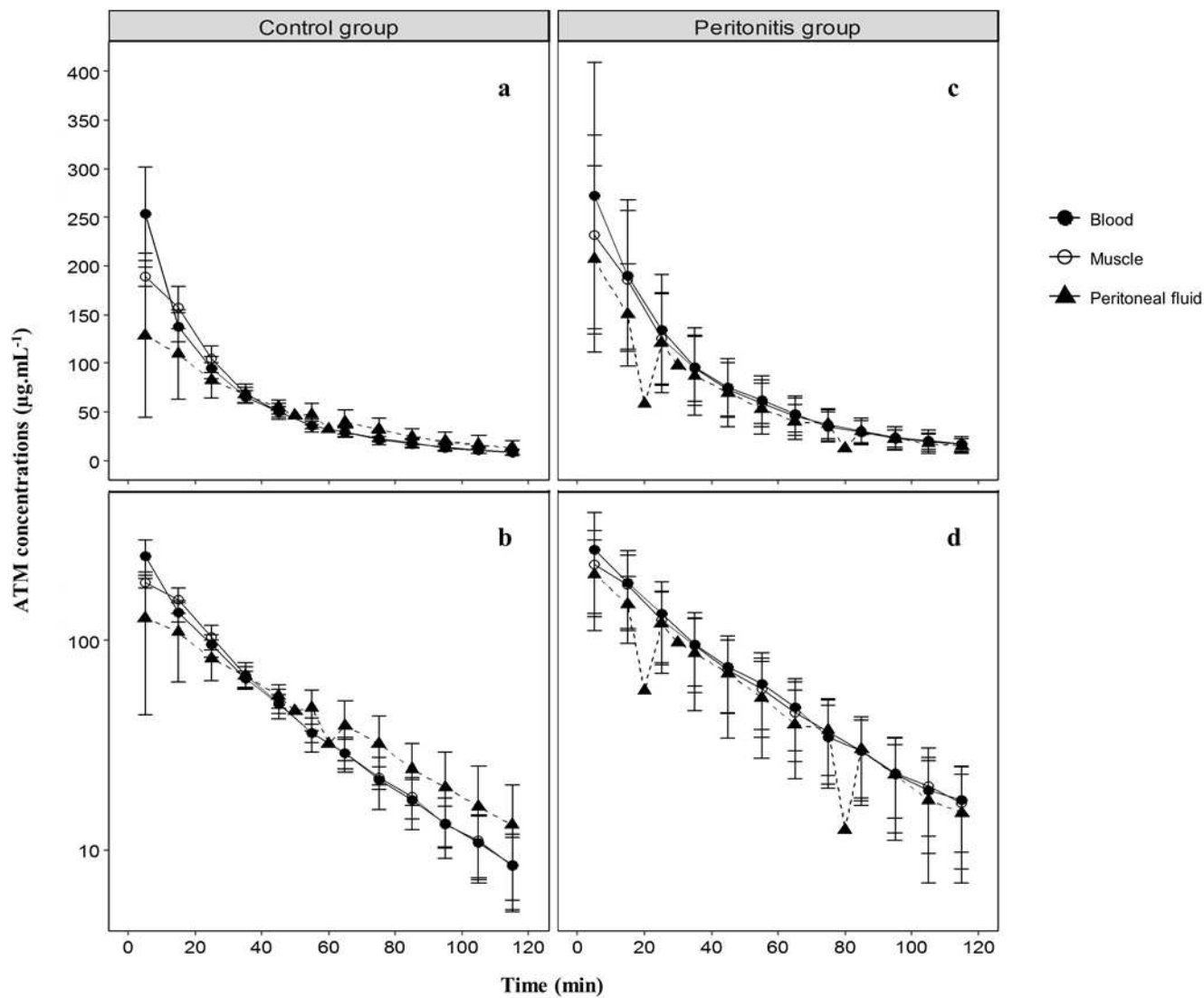


Figure II.1. Unbound ATM concentrations in blood, muscle and PF after an IV-bolus of ATM-AVI combination at a dose of 100-25 mg.kg⁻¹: mean ATM concentrations $\pm$ SD in control rats (a: decimal scale and b: semi-logarithmic scale) and in rats with peritonitis (c: decimal scale and d: semi-logarithmic scale).

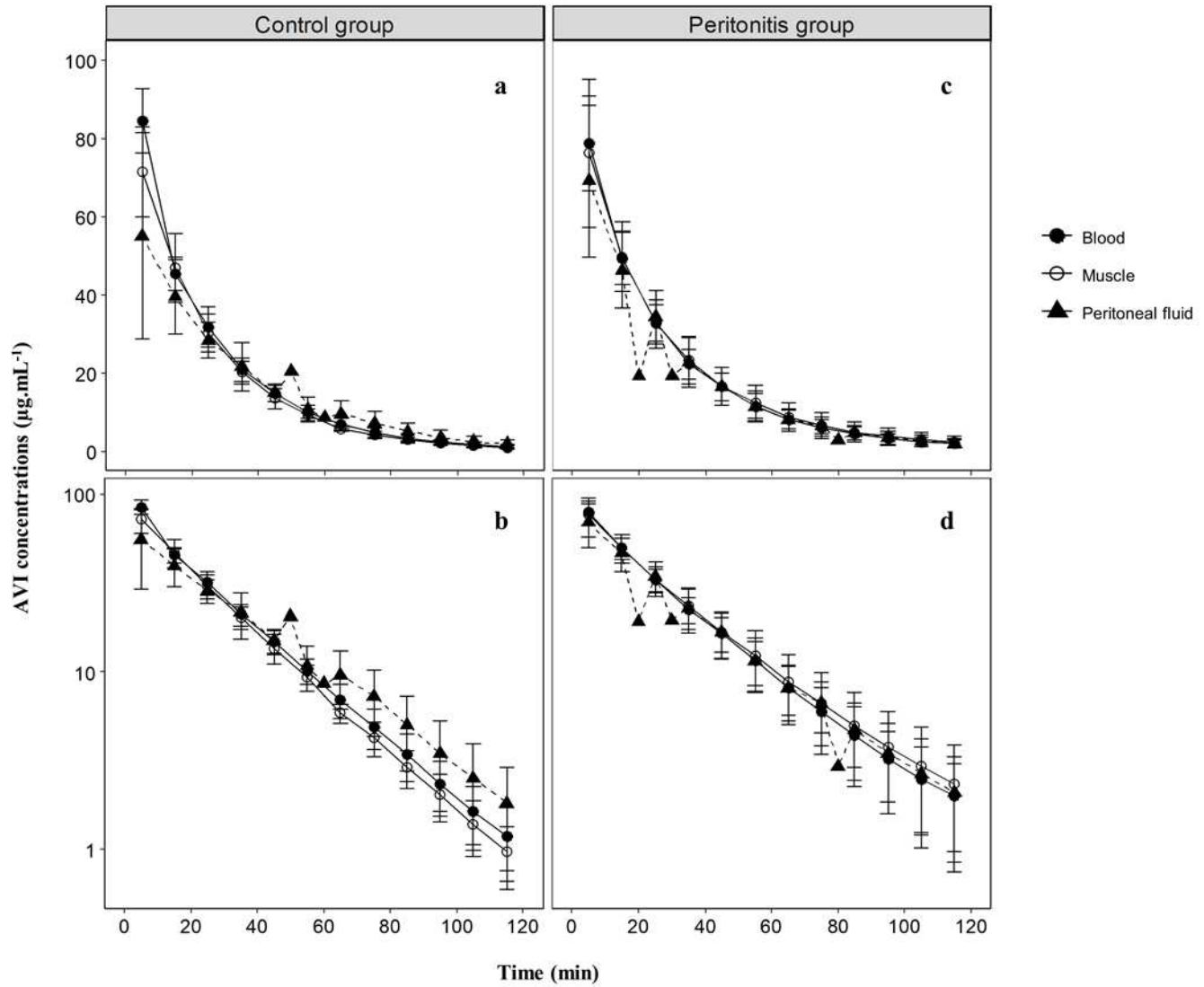


Figure II.2. Unbound AVI concentrations in blood, muscle and PF after an IV-bolus of ATM-AVI combination at a dose of $100\text{-}25 \text{ mg.kg}^{-1}$: mean AVI concentrations $\pm$ SD in control rats (a: decimal scale and b: semi-logarithmic scale), and in rats with peritonitis (c: decimal scale and d: semi-logarithmic scale).

DISCUSSION

The main purpose of this study was to evaluate ATM and AVI distribution in PF and muscle in healthy and infected rats using microdialysis. Muscle was chosen to be a control as only simple bi-directional passive diffusion occurs in this tissue (12).

Numerous microdialysis studies have been conducted in rats to investigate antibiotics distribution in tissues (8) but not for ATM and AVI. This approach allows determination of unbound drug concentrations continuously in different tissues but in the present study, the microdialysis was also used to determine unbound drug concentrations in blood by introducing a microdialysis probe in a vein, as previously described (13, 14). Unbound blood concentrations thus determined were compared to unbound concentrations measured in tissues for a same rat without performing repeated blood sampling which may induce hypovolemia and therefore alter drug distribution characteristics (15). Probe recoveries varied widely between rats and between media (blood, muscle and PF), but this variability was comparable to that previously observed, for other β -lactams as imipenem, in the same tissues (16-18). Probe recoveries were generally higher for AVI than for ATM, possibly due to the fact that AVI has a lower molecular weight than ATM ($435.43 \text{ g.mol}^{-1}$ for ATM and $265.24 \text{ g.mol}^{-1}$ for AVI), considering that both molecules present similar characteristics in terms of hydrophilicity ($\text{LogD at pH 7.4} = -6.02$ for ATM and -6.77 for AVI) (ChemSpider).

ATM and AVI pharmacokinetic parameters were derived from unbound blood concentrations and therefore could not be compared, except for the half-life, with previously reported values determined using total concentrations. Mean ATM half-life determined in control rats (25.8 min) was consistent with previously obtained value (24.6 min) (19) whereas regarding AVI, a study, performed in rats with intra-abdominal abscesses, reported a higher half-life value (43.8 min) (20) than those determined in this study (18.8 min in control rats and 21.4 min in rats with peritonitis). ATM and AVI are mainly excreted unchanged in urine, however in the present study, mean unbound clearances of ATM and AVI in control rats ($12.8 \text{ mL.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ and $10.6 \text{ mL.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, respectively) were greater than the glomerular filtration rate in rat ($5.24 \text{ mL.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$) (21) suggesting that these compounds are not only filtered through the kidney but also actively secreted (22, 23). Mean ATM volume of distribution (473 mL.kg^{-1}), unlike AVI (285 mL.kg^{-1}), was slightly higher than total extracellular body water volume (297 mL.kg^{-1}) (21). The first main observation, in the present study, was that

ATM and AVI AUCs were not statistically different between blood, muscle and PF in control group which is consistent with basic pharmacokinetic concepts (24) and with previous results observed in tissues without efflux transporter or peripheral degradation such as lung and muscle (18, 25, 26). Moreover, the second main observation was that mean pharmacokinetic parameters of both molecules were not affected by the infection even though between-rat variability was higher in infected animals, as it was also observed in humans with other antibiotics (27, 28). The lack of effect of peritonitis on ATM and AVI distribution in PF is consistent with what was previously observed in an intraperitoneal microdialysis study of imipenem in rat (16). However, this observation is not in agreement with results obtained during previous microdialysis studies conducted with carbapenems (imipenem and meropenem) (2, 29) in critical-care patients with peritonitis where some intraperitoneal degradation was described for these antibiotics. Therefore a clinical study with ATM and AVI in humans could be necessary to further investigate this issue even if the cecal ligation and puncture (CLP) model used in the present experiment is considered the gold-standard model for polymicrobial septic peritonitis (30, 31). This model that mimics the hemodynamic (increased blood flow in the early stage followed by decreased blood flow in the late stage) and metabolic changes (hyperglycemia and hyperinsulinemia in the early phase followed by hypoglycemia, hypoinsulinemia and increased serum lactates during late stage) of human disease (30, 32-34) can be easily reproduced in animals, as showed in the present study where an increase of lactate concentrations and an hypoglycemia were observed in peritonitis group. However, a recent study compared the CLP model with the colon ascendens stent peritonitis (CASP) which is another model of polymicrobial sepsis where a stent is surgically inserted into the ascending colon and causes continuous influx of enteric bacteria into the peritoneal cavity and showed that the two models could reflect different kind of diseases (35). The CASP model, resulting in a continuously increasing systemic infection and inflammation, resembles diffuse peritoneal infection while CLP, producing more moderate inflammation and local bacterial spread, represents a model of intra-abdominal abscess formation. Therefore, since CLP and CASP result in different pathophysiology and clinical features, the choice of the animal model could have an impact on the pharmacokinetic and the distribution of ATM and AVI within tissues.

In conclusion, this study has clearly demonstrated that ATM and AVI distribute rapidly and freely in muscle and PF, both in the absence and in the presence of infection

induced by cecal ligation and puncture in rats, suggesting that unbound ATM and AVI concentrations in blood should reflect unbound concentrations at the infection site and should therefore be used to predict the antibacterial effect.

ACKNOWLEDGMENTS

This research project is partially funded by the Innovative Medicine Initiative Joint undertaking under COMBACTE-CARE grant agreement 115620 resources of which are composed of financial contribution from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) and European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA) companies in kind contribution. Avibactam dry powder was provided by AstraZeneca.

The authors thank program Nouvelle Aquitaine CPER 2015-2020 and FEDER 2014-2020 for their participation in equipment funding. The biochemistry department of Poitiers University Hospital is also acknowledged for its assistance in lactate and glucose determinations. This work has benefited from the facilities and expertise of PREBIOS platform (University of Poitiers).

REFERENCES

1. Friedman G, Silva E, Vincent JL. 1998. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 26:2078-86.
2. Dahyot-Fizelier C, Lefeuvre S, Laksiri L, Marchand S, Sawchuk RJ, Couet W, Mimoz O. 2010. Kinetics of imipenem distribution into the peritoneal fluid of patients with severe peritonitis studied by microdialysis. *Clin Pharmacokinet* 49:323-34.
3. Sartelli M, Viale P, Catena F, Ansaloni L, Moore E, Malangoni M, Moore FA, Velmahos G, Coimbra R, Ivatury R, Peitzman A, Koike K, Leppaniemi A, Biffi W, Burlew CC, Balogh ZJ, Boffard K, Bendinelli C, Gupta S, Kluger Y, Agresta F, Di Saverio S, Wani I, Escalona A, Ordonez C, Fraga GP, Junior GA, Bala M, Cui Y, Marwah S, Sakakushev B, Kong V, Naidoo N, Ahmed A, Abbas A, Guercioni G, Vettoretto N, Diaz-Nieto R, Gerych I, Trana C, Faro MP, Yuan KC, Kok KY, Mefire AC, Lee JG, Hong SK, Ghnnam W, Siribumrungwong B, Sato N, Murata K, et al. 2013. 2013 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections. *World J Emerg Surg* 8:3.
4. Liu P, Muller M, Derendorf H. 2002. Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations versus tissue concentrations. *Int J Antimicrob Agents* 19:285-90.
5. Rowland M, Tozer TN. 2007. *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and applications*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
6. Muller M, dela Pena A, Derendorf H. 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: distribution in tissue. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1441-53.
7. Brunner M, Derendorf H. 2006. Clinical microdialysis: Current applications and potential use in drug development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 25:674-680.
8. de la Pena A, Liu P, Derendorf H. 2000. Microdialysis in peripheral tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 45:189-216.
9. Singh R, Kim A, Tanudra MA, Harris JJ, McLaughlin RE, Patey S, O'Donnell JP, Bradford PA, Eakin AE. 2015. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of a beta-lactam and beta-lactamase inhibitor combination: a novel approach for aztreonam/avibactam. *J Antimicrob Chemother* 70:2618-26.
10. Sy SK, Beaudoin ME, Zhuang L, Loblein KI, Lux C, Kissel M, Tremmel R, Frank C, Strasser S, Heuberger JA, Mulder MB, Schuck VJ, Derendorf H. 2016. In vitro pharmacokinetics/pharmacodynamics of the combination of avibactam and aztreonam against MDR organisms. *J Antimicrob Chemother* 71:1866-80.
11. Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJ, Baron EJ, O'Neill PJ, Chow AW, Dellinger EP, Eachempati SR, Gorbach S, Hilfiker M, May AK,

- Nathens AB, Sawyer RG, Bartlett JG. 2010. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 50:133-64.
12. Mauric O, Thallinger C, Kugler SA, Joukhadar SM, Kovar FM, Konz KH, Graninger W, Joukhadar C. 2011. The ability of fluconazole to penetrate into ventilated, healthy and inflamed lung tissue in a model of severe sepsis in rats. *Pharmacology* 87:130-4.
 13. Liu D, Xu S, Xiao H, Wang Z, Mao N, Zhou J, Liu R, Huang Y. 2014. Quantitative determination of unbound levofloxacin by simultaneous microdialysis in rat pancreas after intravenous and oral doses. *J Pharm Pharmacol* 66:1215-21.
 14. Huang YJ, Liao JF, Tsai TH. 2005. Concurrent determination of thalidomide in rat blood, brain and bile using multiple microdialysis coupled to liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 19:488-93.
 15. Verbeeck RK. 2000. Blood microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies. *Adv Drug Deliv Rev* 45:217-28.
 16. Lefeuvre S, Marchand S, Lamarche I, Mimoz O, Couet W. 2006. Microdialysis study of imipenem distribution in the intraperitoneal fluid of rats with or without experimental peritonitis. *Antimicrob Agents Chemother* 50:34-7.
 17. Lefeuvre S, Marchand S, Pariat C, Lamarche I, Couet W. 2008. Microdialysis study of imipenem distribution in the peritoneal fluid of rats with experimental acute pancreatitis. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1516-8.
 18. De La Pena A, Dalla Costa T, Talton JD, Rehak E, Gross J, Thyroff-Friesinger U, Webb AI, Muller M, Derendorf H. 2001. Penetration of cefaclor into the interstitial space fluid of skeletal muscle and lung tissue in rats. *Pharm Res* 18:1310-4.
 19. Kita Y, Fugono T, Imada A. 1986. Comparative pharmacokinetics of carumonam and aztreonam in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 29:127-34.
 20. Slegler T, Gangl E, Pop-Damkov P, Krause KM, Laud PJ, Slee AM, Nichols WW. 2017. Efficacy of ceftazidime-avibactam in a rat intra-abdominal abscess model against a ceftazidime- and meropenem-resistant isolate of *Klebsiella pneumoniae* carrying blaKPC-2. *Journal of Chemotherapy* 30:95-100.
 21. Davies B, Morris T. 1993. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res* 10:1093-5.
 22. Ramsey C, MacGowan AP. 2016. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam. *J Antimicrob Chemother* 71:2704-12.

23. Vishwanathan K, Mair S, Gupta A, Atherton J, Clarkson-Jones J, Edeki T, Das S. 2014. Assessment of the mass balance recovery and metabolite profile of avibactam in humans and in vitro drug-drug interaction potential. *Drug Metab Dispos* 42:932-42.
24. Rowland M, Tozer TM. 1989. Small volume of distribution, p 438-450, *Clinical pharmacokinetics: concepts and applications*, 2nd ed. Lea and Febiger, Philadelphia, Pa.
25. Marchand S, Dahyot C, Lamarche I, Mimoz O, Couet W. 2005. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of noninfected rats. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2356-61.
26. Dalla Costa T, Nolting A, Kovar A, Derendorf H. 1998. Determination of free interstitial concentrations of piperacillin-tazobactam combinations by microdialysis. *J Antimicrob Chemother* 42:769-78.
27. Felton TW, Ogungbenro K, Boselli E, Hope WW, Rodvold KA. 2018. Comparison of piperacillin exposure in the lungs of critically ill patients and healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 73:1340-1347.
28. Minichmayr IK, Schaeftlein A, Kuti JL, Zeitlinger M, Kloft C. 2017. Clinical Determinants of Target Non-Attainment of Linezolid in Plasma and Interstitial Space Fluid: A Pooled Population Pharmacokinetic Analysis with Focus on Critically Ill Patients. *Clin Pharmacokinet* 56:617-633.
29. Karjagin J, Lefeuvre S, Oselin K, Kipper K, Marchand S, Tikkerberi A, Starkopf J, Couet W, Sawchuk RJ. 2008. Pharmacokinetics of meropenem determined by microdialysis in the peritoneal fluid of patients with severe peritonitis associated with septic shock. *Clin Pharmacol Ther* 83:452-9.
30. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. 2005. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 4:854-65.
31. Nemzek JA, Hugunin KM, Opp MR. 2008. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comp Med* 58:120-8.
32. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, Bland KI, Chaudry IH. 2005. Cecal ligation and puncture. *Shock* 24 Suppl 1:52-7.
33. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. 2011. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 19:198-208.
34. Deitch EA. 1998. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 9:1-11.
35. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke CD. 2004. Cecal ligation and puncture versus colon

ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. Shock 21:505-11.

36. Sillen H, Mitchell R, Sleight R, Mainwaring G, Catton K, Houghton R, Glendinning K. 2015. Determination of avibactam and ceftazidime in human plasma samples by LC-MS. Bioanalysis 7:1423-34.

Article III :

Pharmacodynamic Modeling of β -lactam - β -lactamase Inhibitor Checkerboard Data: Illustration with Aztreonam-Avibactam

Alexia Chauzy¹, Julien M. Buyck¹, Boudewijn L.M. de Jonge², Sandrine Marchand^{1,3}, Nicolas Grégoire¹, William Couet^{1,3}

¹ INSERM, U1070, UFR de Médecine Pharmacie, Université de Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France

² Pfizer Essential Health, New York, USA

³ Laboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86000 Poitiers, France

Intended category: Research note

Article soumis dans Clinical Microbiology and Infection (Juillet 2018)

ABSTRACT

Objectives: Checkerboard experiments followed by Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index determinations are commonly used to assess *in vitro* pharmacodynamic interactions between combined antibiotics, but FIC index cannot be determined in case of antibiotic/non-active compound combinations. The aim of this study was to use a simple modeling approach to quantify the *in vitro* activity of aztreonam-avibactam (ATM-AVI), a new β -lactam- β -lactamase inhibitor (BL-BLI) combination.

Methods: MIC checkerboard experiments were performed with 12 *Enterobacteriaceae* with diverse β -lactamases profiles. ATM MICs in the absence and presence of AVI at different concentrations (ranging from 0.0625 to 4 mg/L) were determined. ATM MIC versus AVI concentrations were fitted by an inhibitory $E_{\max}$ model with a baseline effect parameter.

Results: A concentration-dependent relationship was observed with a rapid initial reduction of ATM MIC at low AVI concentrations and reaching a maximum at higher AVI concentrations, that was adequately fitted by the model. AVI efficacy was characterized by the ratio of ATM MICs in the absence of AVI (MIC_0) and when AVI concentration tends toward infinity (MIC_{∞}), and ranged between 90 and 10068. AVI potency was characterized by AVI concentrations corresponding to 50% of the maximum effect (IC_{50} values between 0.00022 and 0.053 mg/L).

Conclusions: An inhibitory $E_{\max}$ model with a baseline effect could quantify AVI efficacy and potency among various strains. This simple modeling approach can be used to compare the activity of other combinations of antibiotics with non-antibiotic drugs when FIC index is inappropriate.

Keywords: Checkerboard, Combinations, β -lactam antibiotic, β -lactamase inhibitor

INTRODUCTION

Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) represent a major threat to human health worldwide (1). These pathogens are resistant to most prescribed antibiotics due to the production of various types of β -lactamases and are extremely hard to eradicate. Combining a β -lactam antibiotic with a β -lactamase inhibitor to inactivate β -lactamase activity constitutes an interesting option for treating CRE infections (2). Aztreonam-avibactam (ATM-AVI) is one of the new β -lactam- β -lactamase inhibitor (BL-BLI) combinations under development. ATM is a monobactam antibiotic which is not hydrolyzed by metallo- β -lactamases (MBLs) that inactivate most β -lactam antibiotics (3). Yet it is hydrolyzed by some serine β -lactamases, such as extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and serine carbapenemases including KPC (3). However, these serine β -lactamases are efficiently inhibited by the β -lactamase inhibitor AVI (4). Therefore, combining ATM with AVI is expected to restore the clinical utility of ATM against CRE.

Pharmacodynamic interaction between antibiotics used in combination is usually investigated by performing checkerboard experiments followed by Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index determinations (5). This is based on the comparison of the MIC of each antibiotic alone (MIC_A and MIC_B for antibiotics A and B, respectively) with the combination-derived MICs ($MIC_{A/B}$ and $MIC_{B/A}$) (**Equation III.1**).

$$FIC\ index = \frac{MIC_{A/B}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B/A}}{MIC_B}$$

(**Equation III.1**)

It is a simple approach that can be used for rapid screening of antibiotic combinations in the presence of various strains. However, if an antibiotic is combined with a non-antibiotic compound, such as a β -lactamase inhibitor, the FIC index cannot be determined since the non-antibiotic drug has *a priori* no antimicrobial activity and cannot be characterized by an MIC value. Antimicrobial activity has been reported for non-antibiotic compounds, but with MIC values much higher than concentrations clinically achievable (6, 7). Accordingly, antibiotic/non-antibiotic combinations have been defined as synergistic (27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, abstract P0655) but for non-antibiotic drug concentrations corresponding to toxic concentrations (8).

The objective of the present study was to use a simple but meaningful modeling approach for the analysis of checkerboard-type data obtained with BL-BLI combinations, or any combination of an active antibiotic with a non-active compound, based on the $E_{\max}$ model previously used in that context (9) or to describe the pro-convulsant effect of biphenyl acetic acid on fluoroquinolones (10).

METHODS

Chemicals

ATM (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and AVI (provided as a dry powder by AstraZeneca, Macclesfield, United Kingdom) were used to prepare stock solutions of 50 mg/mL of ATM in methanol/dimethyl sulfoxide (50/50, v/v) and 1 mg/mL of AVI in sterile water. ATM and AVI stock solutions were further diluted in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB).

Bacterial strains

Twelve multi-drug resistant (MDR) *Enterobacteriaceae* including 4 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Escherichia coli*, 2 *Citrobacter freundii*, 3 *Enterobacter cloacae* and 1 *Enterobacter aerogenes* were studied (**Table III.1**). The β -lactamase content of each strain was characterized by IHMA laboratory (International Health Management Associates, Inc., Schaumburg, IL, USA) through PCR.

In vitro susceptibility testing

For each bacterial strain, MICs of ATM and AVI alone were determined according to the EUCAST guidelines for broth microdilutions (11). ATM MICs in the presence of AVI were also determined using checkerboard method. Checkerboards were set up with 2-fold dilutions of ATM (0.0078 to 512 mg/L) and AVI (0.0625 to 4 mg/L) in such a way that different combinations of ATM and AVI concentrations were obtained in each well. After drug dilution, 96-well plates were inoculated with each organism to yield the appropriate density (0.5×10^6 CFU/mL) and incubated for 16 to 20 h at 37°C. The MIC was recorded as the

lowest concentration of antimicrobial agent that completely inhibited visible growth of the organism in microdilution wells. Negative growth controls were performed in wells containing only CAMHB. All experiments were performed in duplicate.

Data analysis

The antibacterial effect of ATM in combination with AVI was investigated by modeling the interaction between both compounds, using WinNonlin software (version 6.2, Certara, Princeton, NJ, USA). ATM MICs versus AVI concentrations were fitted according to an inhibitory $E_{\max}$ model with a baseline effect parameter (**Equation III.2**). A Gauss-Newton minimization method with the Levenberg and Hartley modification was used for data fitting.

$$\text{MIC} = \text{MIC}_0 - \frac{(\text{MIC}_0 - \text{MIC}_\infty) \times C_{\text{AVI}}}{(C_{\text{AVI}} + \text{IC}_{50})} \quad (\text{Equation III.2})$$

Where, MIC_0 is the MIC of ATM in the absence of AVI and MIC_∞ the asymptotic value of MIC when AVI concentration (C_{AVI}) tends toward infinity. $\text{MIC}_0/\text{MIC}_\infty$ ratio characterizes the efficacy of AVI, while IC_{50} , the AVI concentration corresponding to 50% of the maximum inhibitory effect, characterizes the potency of AVI.

RESULTS

The inhibitory $E_{\max}$ model with a baseline effect parameter adequately described the rapid initial decay of ATM MIC in the presence of very low AVI concentrations before reaching a plateau at higher AVI concentrations, as shown in the individual plots (**Figure III.1**). However, for *E. coli* 1266865, a slightly different profile was observed, with a much slower decrease of ATM MIC in the presence of increasing AVI concentrations and no plateau within this range of AVI concentrations. For the other strains AVI efficacy ($\text{MIC}_0/\text{MIC}_\infty$) was ranging between roughly 100 and 10 000, and potency (IC_{50}) between 0.00022 and 0.053 mg/L (**Table III.1**). High efficacy had a tendency to be associated with high potency (low IC_{50}).

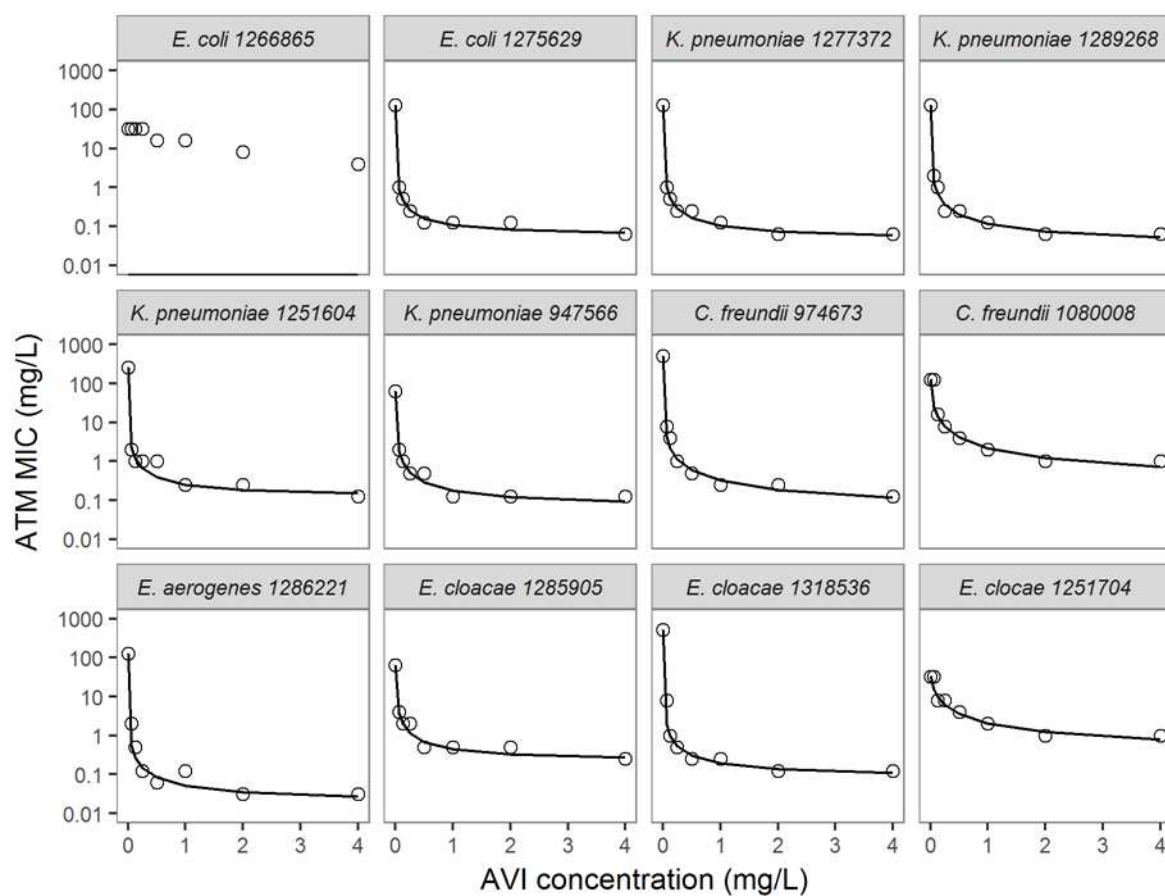


Figure III.1. ATM MICs versus AVI concentrations (mg/L) for 12 *Enterobacteriaceae* isolates. The circles represent the ATM MICs determined during one checkerboard experiment and the solid lines the individual ATM MICs predicted by the $E_{\max}$ model with baseline effect. Representative results are presented for each isolate. Experiments were performed in duplicate, without significant differences in results.

Table III.1. Parameter estimates of the inhibitory $E_{\max}$ model with baseline effect for 12 MDR *Enterobacteriaceae* isolates

Organism	IHMA No.	β -lactamases	ATM MIC (mg/L)	Parameter estimates (CV%)			
				MIC ₀ (mg/L)	MIC _∞ (mg/L)	MIC ₀ /MIC _∞	AVI IC ₅₀ (mg/L)
<i>Escherichia coli</i>	1266865	TEM-OSBL(b), CMY-42, NDM-5	32	ND	ND	ND	ND
	1275629	CTX-M-15, VIM-23	128	128 (22)	0.056 (22)	2262	0.00040 (27)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1277372	SHV-12(e), TEM-OSBL(b), CTX-M-15, NDM-7	128	128 (20)	0.044 (22)	2894	0.00047 (24)
	1289268	SHV-OSBL(b), TEM-OSBL(b), CTX-M-15, VIM-4	128	127 (32)	0.033 (50)	3909	0.00064 (38)
	1251604	SHV-5(e), VIM-26	256	256 (33)	0.12 (32)	2178	0.00053 (39)
	947566	SHV-12(2be), VIM-42	64	64 (29)	0.064 (41)	995	0.0018 (36)
<i>Citrobacter freundii</i>	974673	SHV-12(2be), TEM-OSBL(2b), CTX-M-3, CMY-34, NDM-1	512	511 (32)	0.051 (83)	10068	0.00053 (38)
	1080008	VIM-23	128	133 (38)	0.23 (166)	580	0.015 (49)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1286221	TEM-OSBL(b), CTX-M-15, NDM-1	128	127 (46)	0.019 (64)	6808	0.00026 (58)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1285905	CTX-M-15, NDM-1	64	64 (30)	0.21 (32)	299	0.0037 (38)
	1318536	CTX-M-15, NDM-1	512	510 (35)	0.083 (41)	6182	0.00022 (43)
	1251704	TEM-OSBL(b), VIM-1	32	33 (30)	0.37 (84)	90	0.053 (47)

ND, not determined.

DISCUSSION

An inhibitory $E_{\max}$ model with a baseline effect parameter successfully described the effect of AVI on ATM MIC in all but one strain. The presence of AVI dramatically reduced ATM MIC, up to roughly 100 to 10 000 folds and starting at low concentrations (most IC_{50} values $\ll 0.1$ mg/L). Because AVI possess some intrinsic antibacterial activity at relatively high levels ($MIC \geq 8$ mg/L) (12), the maximum concentration of AVI used in these checkerboard experiments was 4 mg/L in order to restrict this investigation to the effect of AVI on ATM MIC, presumably due to β -lactamases inhibition. Efficacy and potency of AVI were highly variable between strains, reflecting the wide range of β -lactamases produced by the different strains and the difference of affinity of β -lactamases for AVI (13). However, model-derived ATM MIC in the absence of AVI was higher for *E.cloacae* 1318536 ($MIC = 510$ mg/L) than for *E.cloacae* 1285905 ($MIC = 64$ mg/L) although both strains express exactly the same β -lactamases, suggesting differences in efflux or outer membrane permeability as well as in expression levels of enzymes between the two strains.

Compared with FIC index that only concludes to synergism, additivity or antagonism, the $E_{\max}$ model can quantify efficacy and potency among various strains or BL-BLI combinations and is therefore more informative. This simple $E_{\max}$ model was previously used to characterize the activity of an experimental BLI in combination with imipenem for selecting optimal dosing strategies of the combination (9). However, this objective may fall beyond the limits of these checkerboard experiments. Alternative approaches such as time-kill experiments combined with semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) modeling to characterize ATM-AVI combination are better suited for that (14).

Yet simple checkerboard experiments analyzed with an $E_{\max}$ model seem appropriate for comparing BL-BLI combinations efficacy and potency in the presence of various MDR strains when FIC index is inappropriate.

FUNDING

This research project was funded by the Innovative Medicine Initiative Joint undertaking under COMBACTE-CARE grant agreement 115620 resources of which are composed of financial contribution from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) and European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA) companies in kind contribution. Avibactam dry powder was provided by AstraZeneca.

ACKNOXLEDGMENTS

This study was presented in part at the annual meeting of the International Society of Anti-Infective Pharmacology, Vienna, Austria, 2017. We thank Emma Marquizeau for her technical assistance with the checkerboard experiments.

CONFLICT OF INTEREST

Boudewijn de Jonge is currently an employee of Pfizer.

REFERENCES

- [1] Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):413-31.
- [2] Perez F, El Chakhtoura NG, Papp-Wallace KM, Wilson BM, Bonomo RA. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: can we apply "precision medicine" to antimicrobial chemotherapy? *Expert Opin Pharmacother.* 2016;17(6):761-81.
- [3] Biedenbach DJ, Kazmierczak K, Bouchillon SK, Sahm DF, Bradford PA. In vitro activity of aztreonam-avibactam against a global collection of Gram-negative pathogens from 2012 and 2013. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(7):4239-48.
- [4] Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang J, Maharjan S, Doumith M, et al. Activities of NXL104 combinations with ceftazidime and aztreonam against carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1):390-4.
- [5] White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(8):1914-8.
- [6] Martins M, Dastidar SG, Fanning S, Kristiansen JE, Molnar J, Pages JM, et al. Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(3):198-208.
- [7] Nigam A, Gupta D, Sharma A. Treatment of infectious disease: beyond antibiotics. *Microbiol Res.* 2014;169(9-10):643-51.
- [8] Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Andresen H, Schmoldt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care.* 2012;16(4):R136.
- [9] Bhagunde P, Chang KT, Hirsch EB, Ledesma KR, Nikolaou M, Tam VH. Novel modeling framework to guide design of optimal dosing strategies for beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2237-40.
- [10] Marchand S, Pariat C, Boulanger A, Bouquet S, Couet W. A pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to show that not all fluoroquinolones exhibit similar sensitivity toward the proconvulsant effect of biphenyl acetic acid in rats. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(6):813-20.
- [11] European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST

Discussion Document E. Dis 5.1: determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. Clin Microbiol Infect. 2003;9:1-7.

[12] Berkhout J, Melchers MJ, van Mil AC, Nichols WW, Mouton JW. In vitro activity of ceftazidime-avibactam combination in in vitro checkerboard assays. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(2):1138-44.

[13] Ehmann DE, Jahic H, Ross PL, Gu RF, Hu J, Kern G, et al. Avibactam is a covalent, reversible, non-beta-lactam beta-lactamase inhibitor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(29):11663-8.

[14] Sy S, Zhuang L, Xia H, Beaudoin ME, Schuck VJ, Derendorf H. Prediction of in vivo and in vitro infection model results using a semimechanistic model of avibactam and aztreonam combination against multidrug resistant organisms. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol. 2017;6(3):197-207

Article IV :

Semi-mechanistic Pharmacodynamic Modeling of Aztreonam-Avibactam Combination to Understand its Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria

Alexia Chauzy^{1,2}, Bruna Gaelzer Silva Torres^{1,2}, Julien Buyck^{1,2}, Boudewijn de Jonge⁴, Christophe Adier^{1,3}, Sandrine Marchand^{1,2,3}, William Couet^{1,2,3}, Nicolas Grégoire^{1,2}

¹ INSERM, U1070, Pôle Biologie Santé, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France

² Université de Poitiers, UFR de Médecine Pharmacie, 6 rue de la milétrie, 86000 Poitiers, France

³ Laboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86000 Poitiers, France

⁴ Pfizer Essential Health, Cambridge, USA

Article soumis dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Août 2018)

ABSTRACT

Aztreonam-avibactam (ATM-AVI) is a promising combination to treat serious infections caused by multi-drug resistant (MDR) pathogens. Three distinct effects have been previously characterized for AVI: inhibition of ATM degradation by β -lactamases, proper bactericidal effect and enhancement of ATM bactericidal activity. The aim of this study was to investigate the individual contribution of each of the three AVI effects using a semi-mechanistic PK-PD modelling approach. Four MDR *Enterobacteriaceae* with different β -lactamase profiles were used in *in vitro* static time-kill studies using wide concentration ranges of ATM and AVI alone and in combination. In order to take into account ATM degradation, the actual concentrations of ATM were determined by LC-MS/MS. The time course of bacteria response was first modeled and, thereafter, ATM degradation was integrated into the model. The model succeeded in capturing the bacterial growth, killing kinetics, and regrowth, and ATM degradation profiles for all strains. Simulations were conducted in order to evaluate the impact of the three AVI effects separately at clinical range of ATM and AVI concentrations. Even though AVI prevented ATM degradation, model simulations predicted that the combined bactericidal activity was mostly explained by AVI enhancing effect within ATM and AVI concentrations currently approved clinically. Decisions on suitable dosing regimens for ATM-AVI combination in particular and, more generally, for any β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination should be made considering if the β -lactamase inhibitor is able or not to enhance β -lactam activity and not only the spectrum of β -lactamases inhibited by β -lactamase inhibitor.

INTRODUCTION

Aztreonam-avibactam (ATM-AVI) is a promising combination intended to treat serious infections caused by multi-drug resistant (MDR) pathogens, in particular those producing metallo- β -lactamases (MBLs). AVI is a new and potent inhibitor of β -lactamases of Amber classes A and C, including serine-based carbapenemases, and some class D but it does not inhibit class B MBLs. However, in combination with ATM, a monobactam antibiotic which is not hydrolyzed by MBLs, AVI can restore the ATM antibiotic activity against strains that produce a broad range of β -lactamases (1).

To better understand the complex pharmacodynamics (PD) of ATM-AVI combination, a semi-mechanistic model - derived from constant-concentration time-kill experiments - was developed by Sy and colleagues (2). The model considered ATM and AVI intrinsic bactericidal activities, ATM degradation due to β -lactamases and its inhibition by AVI. Additionally, a synergistic function characterizing the ability of AVI to enhance ATM activity was implemented into the model. For the *Escherichia coli* strains studied by Sy et al. (2), three effects were identified by the model for AVI: inhibition of β -lactamases, intrinsic bactericidal activity and enhancement of ATM bactericidal activity. For *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* strains only the inhibitory and enhancing effects could be characterized. The same findings were observed when AVI was used in combination with ceftazidime for *P. aeruginosa* strains (3).

β -lactamase inhibitors belonging to the diazabicyclooctane (DBO) class, of which AVI is a representative, can show different type of activities (4). These compounds are able to covalently bind to the active-site serine of a variety of β -lactamases causing enzyme inhibition. They can also have a direct antibacterial activity mainly due to the inhibition of Penicillin-Binding Proteins 2 (PBP2) (5) and can act as an enhancer when combined with β -lactam agents that bind to other PBPs.

This study aimed to further investigate the individual contribution of each of the 3 AVI PD effects with the following steps: first, extend the semi-mechanistic pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model previously described (2) with four additional MDR *Enterobacteriaceae* isolates (representing two additional species), and thereafter, quantify the

impact of each AVI effect by simulating these effects separately in response to clinical ATM and AVI concentrations.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

ATM was purchased from Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France. AVI was supplied by Pfizer, New York, NY, USA. Stock solutions of 50 mg/mL of ATM in methanol/dimethyl sulfoxide (50/50, v/v) and 1 mg/mL of AVI in sterile water were prepared and frozen at -80 °C. The stock solutions were diluted in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) on the day of experiment to achieve the desired concentrations used in the static time-kill studies.

Bacterial strains

Four MDR *Enterobacteriaceae* were obtained from IHMA laboratory (International Health Management Associates, Inc., Schaumburg, IL, USA). All isolates investigated in the present study produced multiple β -lactamases as follow: *Escherichia coli* 1266865 (TEM-OSBL(b), CMY-42, NDM-5), *Citrobacter freundii* 974673 (SHV-12(2be), TEM-OSBL(2b), CTX-M-3, CMY-34, NDM-1), *Enterobacter cloacae* 1285905 (CTX-M-15, NDM-1) and *Enterobacter cloacae* 1318536 (CTX-M-15, NDM-1). Bacteria were stored at -80 °C and sub-cultured in Mueller-Hinton agar plates (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) for 24 h at 37°C prior to each experiment.

In vitro strains susceptibility

For each strain, ATM MICs were determined in the absence and in the presence of AVI (0.004 to 4 mg/L, in 2-fold increments), according to EUCAST broth microdilution method (18). The MICs of AVI without ATM were also determined for the four strains.

Static time-kill studies

The *in vitro* constant-concentration time-kill studies included a growth control, AVI alone, ATM alone and ATM-AVI combinations. The concentrations of ATM alone and in combination were based on its respective MIC values at selected AVI concentrations (ranging

from 0 to 8 mg/L), consisting of 0.25 to 4 times the MIC in 2-fold increment (8). In the experiments performed with AVI as monotherapy, AVI concentrations were chosen to cover the concentrations used in combination plus 1 and 2 fold the MIC of the compound alone, ranging from 0.004 to 64 mg/L. In sum, 32 static time-kill assays were conducted for each strain, including 1 control, 6 levels of AVI alone, 5 levels of ATM alone and 20 ATM-AVI combinations.

On the day of experiment, bacteria inoculum was prepared in sterile saline solution by adjusting the turbidity to a McFarland value of 0.5 corresponding to $\sim 1.5 \times 10^8$ cfu/mL. Then, 200 μ L of the bacterial suspension was added to 20 mL of CAMHB containing different ATM and AVI concentrations, as described above, achieving a final bacterial density of 1.5×10^6 cfu/mL. The flasks were incubated at 37 °C with shaking (150 rpm) and samples were collected at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 21, 24 and 27 h. The samples were diluted in 100-fold increments in sterile water and 100 μ L of each dilution and also undiluted samples were spread on Mueller-Hinton agar plates (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) using an automatic diluter and plater (easySpiral[®] Pro, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France). Bacterial colonies were counted using an automatic colony counter (Scan[®] 300, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France) after 16-18 h of incubation at 37 °C. The lower limit of bacterial colony quantification was 200 cfu/mL. All experiments were performed at least in duplicate on separate occasions.

Drug stability analysis

Actual concentrations of ATM and AVI in the media during the time-kill experiments were measured by LC-MS/MS (Supplemental material) in order to monitor ATM and AVI degradation. Samples collected for bacterial counts were also used for drug quantification: samples collected at time 0, 8, 15 and 24 h were centrifuged (14000 x g for 5 minutes) and supernatants were stored at -80 °C until assay. Since a higher degradation rate was expected in the absence of AVI, additional samples, at time 2, 4, 6, 10, 21 and 27 h, were analyzed for the experiments performed with ATM alone.

Pharmacodynamic model

The previous semi-mechanistic model developed by Sy and colleagues (2) was applied to the time-kill studies data – bacterial counts and drug concentrations – and slightly modified to

describe bacterial response to ATM-AVI combinations and ATM degradation for the additional studied strains. The presence of subpopulations of less sensitive bacteria was confirmed experimentally by culturing the initial inoculum of 10^8 cfu/mL onto agar plates supplemented with ATM-AVI at concentrations of 1 to 16 times the ATM MIC in combination.

The model was developed using NONMEM 7.4 in two steps: first, bacterial counts were fitted assuming no drug degradation; then, parameters related to bacterial response were fixed and drug concentrations data were included in the dataset to estimate the parameters for ATM degradation and inhibition by AVI. In the final model, parameters for both, bacteria and drug data, were estimated simultaneously. The detailed explanation of the *in vitro* PD model is available in the supplemental material.

Simulations

Simulations using the final model (full model) were conducted to predict bacterial counts and ATM concentrations in response to a constant concentration of 25 mg/L of ATM and 4.5 mg/L of AVI, mimicking the average concentrations (C_{avg}) achieved in humans after administration of 2 g ATM and 0.5 g AVI every 8 h (13, 19). Additionally, the final model was reduced by keeping the parameters related to only one AVI effect each time – β -lactamase inhibition, bactericidal activity or enhancement of β -lactam activity – and new simulations were conducted in order to evaluate the individual contribution of each AVI effect. A detailed procedure of how the full model was reduced is described in the supplemental material. Simulations using a model maintaining only the parameters related to ATM bactericidal effect were also performed for comparison purposes. For all additional simulations the same constant average concentrations were employed. Moreover, the way that clinically observed range of ATM-AVI concentrations impacts AVI effects was investigated. Complementary simulations were carried at high (125 and 22.5 mg/L, for ATM and AVI, respectively) and low (5 and 0.9 mg/L, for ATM and AVI, respectively) concentration levels using the final and the reduced models. The high levels were close to peak concentrations (C_{max}) and the low levels to concentrations achieved during the elimination phase after administration of 2 g ATM and 0.5 g AVI every 8 h (13, 19).

RESULTS

In vitro strains susceptibility

MICs of ATM in the absence and presence of 4 mg/L of AVI and MICs of AVI alone are presented in **Table IV.1** for the four strains studied. All strains were resistant to ATM alone resulting in elevated MIC values (between 32 and 512 mg/L). AVI restored the susceptibility of all strains to ATM according to the EUCAST resistant breakpoint of ATM for *Enterobacteriaceae* (> 4 mg/L) (6), although the impact of AVI on *E. coli* strain was much less pronounced than on the others. AVI showed some although limited intrinsic antimicrobial activity with MIC values of 16 and 32 mg/L.

Table IV.1. Susceptibility and β -lactamase content of the MDR strains.

Strain	β -lactamases	MIC (mg/L)		
		ATM	ATM-AVI ^a	AVI
<i>E. coli</i> 1266865	NDM-5, TEM-OSBL(b), CMY-42	32	4	16
<i>C. freundii</i> 974673	NDM-1, SHV-12(2be), TEM-OSBL(2b), CTX-M-3, CMY-34	512	0.125	16
<i>E. cloacae</i> 1285905	NDM-1, CTX-M-15	64	0.25	32
<i>E. cloacae</i> 1318536	NDM-1, CTX-M-15	512	0.125	16

^aAVI at 4 mg/L

Static time-kill studies and drug stability

The static time-kill profiles and ATM degradation are partly shown in **Figures IV.1-4**. Complete profiles containing all ATM-AVI combinations tested are shown in supplemental material (**Figures S1-S4**). Top panels represent bacterial counts over time and bottom panels show the corresponding percentage of ATM remaining in the system.

In the experiments performed with ATM alone (**Figure IV.1-4**, top panels A), for all studied strains, an increase in ATM concentrations resulted in an increase in bacterial killing. Except for *E. coli* 1266865 (**Figure IV.1**, bottom panels A), ATM degradation was observed for all strains at ATM concentrations not sufficient to decrease bacterial counts from the initial inoculum (**Figure IV.2-4**, bottom panels A). ATM degradation was, thus, dependent on

bacterial counts with a rapid degradation observed when bacteria reached $\sim 10^7$ cfu/mL, consistent with previous results (7).

AVI alone has bactericidal activity against all strains at concentrations levels of 1 and 2-fold the MIC (**Figures IV.1-4**, top panels B) and no relevant AVI degradation was observed (data not shown).

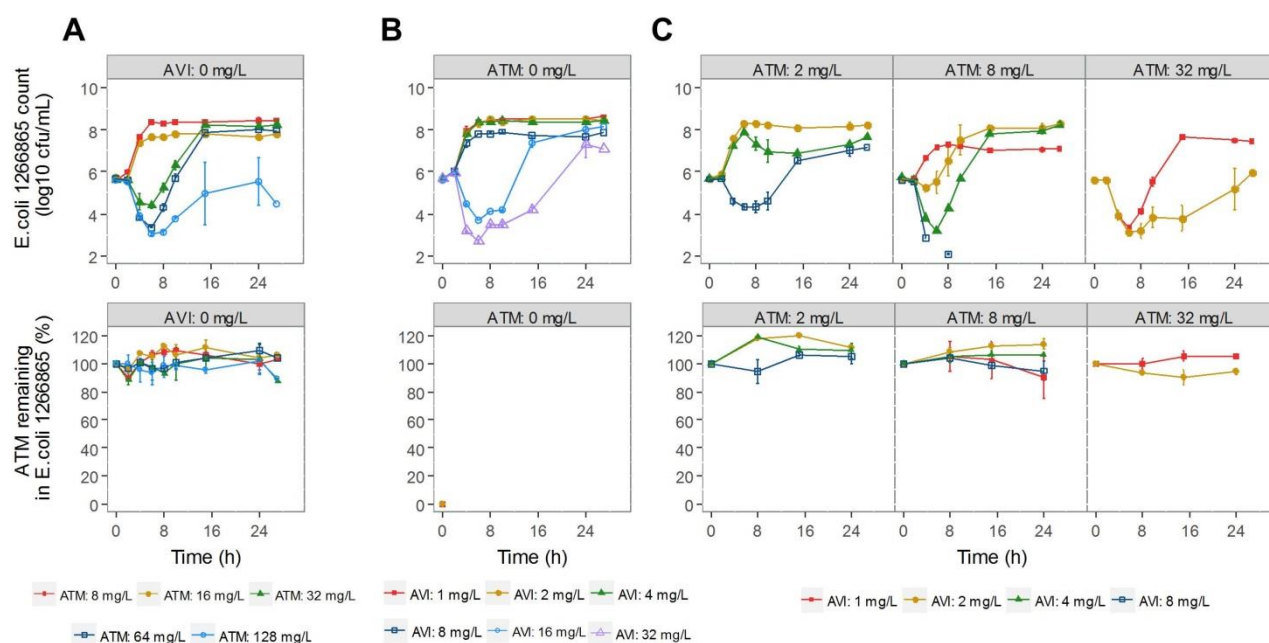


Figure IV.1. Observed static time-kill curves of **A)** ATM alone, **B)** AVI alone and **C)** ATM-AVI in combination against *E. coli* 1266865 over 27 h (top panels) and the percentage of the initial ATM concentration remaining in the system during the time-kill experiments (bottom panels). Symbols represent means and error bars are standard errors.

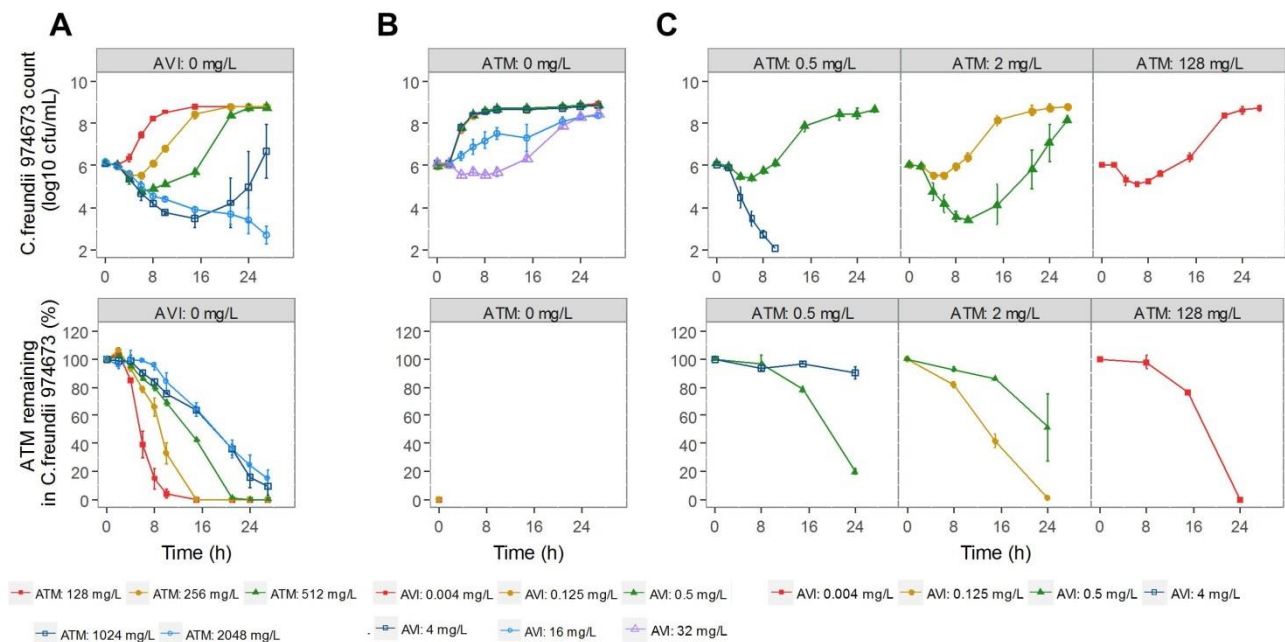


Figure IV.2. Observed static time-kill curves of A) ATM alone, B) AVI alone and C) ATM-AVI in combination against *C. freundii* 974673 over 27 h (top panels) and the percentage of the initial ATM concentration remaining in the system during the time-kill experiments (bottom panels). Symbols represent means and error bars are standard errors.

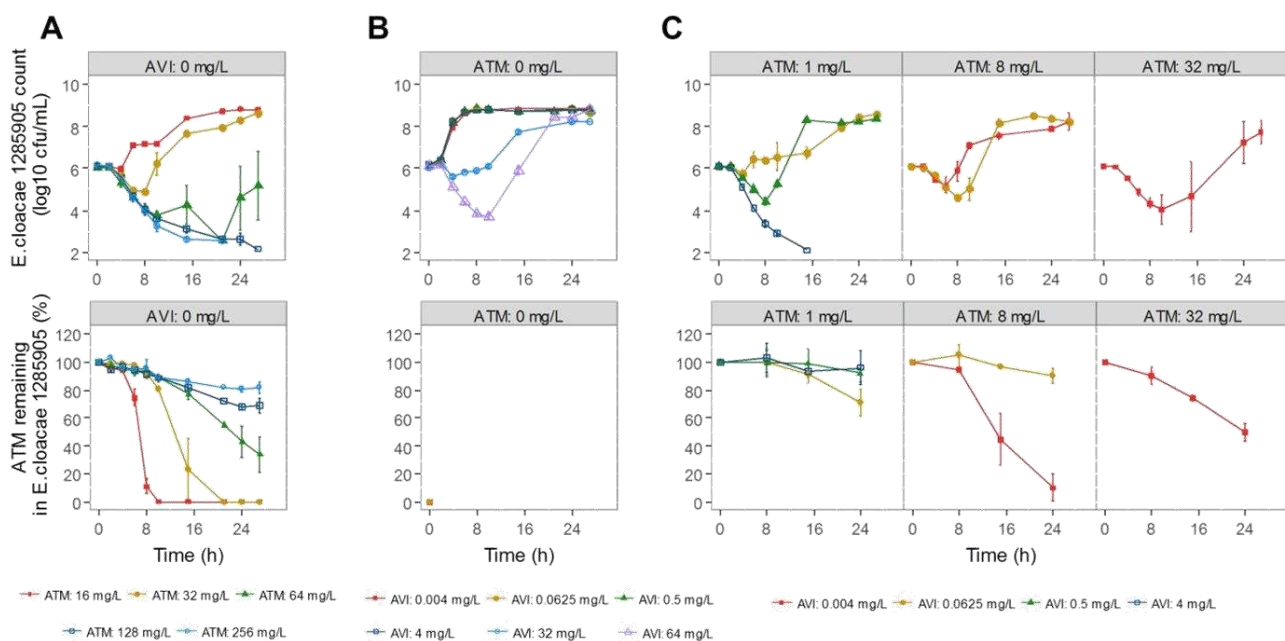


Figure IV.3. Observed static time-kill curves of A) ATM alone, B) AVI alone and C) ATM-AVI in combination against *E. cloacae* 1285905 over 27 h (top panels) and the percentage of the initial ATM concentration remaining in the system during the time-kill experiments (bottom panels). Symbols represent means and error bars are standard errors.

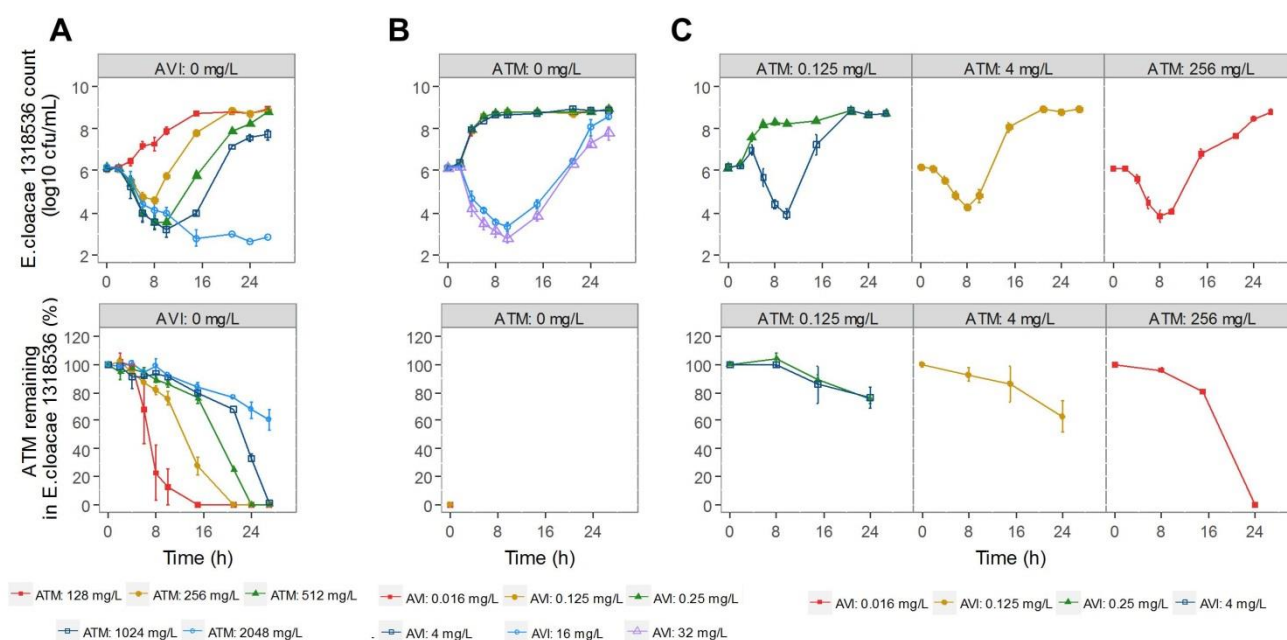


Figure IV.4. Observed static time-kill curves of **A)** ATM alone, **B)** AVI alone and **C)** ATM-AVI in combination against *E. cloacae* 974673 over 27 h (top panels) and the percentage of the initial ATM concentration remaining in the system during the time-kill experiments (bottom panels). Symbols represent means and error bars are standard errors.

In combination, an increase in bacterial susceptibility to ATM was observed resulting from increasing concentrations of AVI; therefore, at a same ATM level, different bactericidal activity was observed according to AVI concentrations (**Figures IV.1-4**, top panels C). In addition, the rate and extent of ATM degradation was also related to AVI concentrations since AVI could prevent ATM degradation in a concentration-dependent manner starting at very low AVI concentrations such as 0.004 mg/L (**Figures IV.2-4**, bottom panels C). By contrast, in *E. coli* 1266865 in which no relevant ATM degradation was observed even in the absence of AVI (**Figure IV.1**, bottom panels A and C), an increase of ATM bactericidal activity related to AVI concentration was still observed (**Figure IV.1**, top panels C).

Pharmacodynamic model

The schematic representation of the refined model that characterized the bacterial response of these four additional studied strains to ATM-AVI combination is illustrated in **Figure IV.5** and model parameter estimates are summarized in **Table IV.2**. Bacterial population was divided in two subpopulations: P_1 (susceptible to both ATM and AVI) and P_2 (less-susceptible to ATM and not responding to AVI). The proportion of P_2 in the initial inoculum was

determined experimentally for each strain and used to determine the initial conditions of P_1 and P_2 (P_2 fraction, **Table IV.2**). At the start of the experiment, the majority of bacteria was in the susceptible state with P_2 being around $1/10^5$ - $1/10^7$ of P_1 . Moreover, differently from the reference model (2), both subpopulations were actively growing at the same growth rate (K_{growth} , **Table IV.2** and **Figure IV.5**) and no conversion between bacteria subpopulation was assumed.

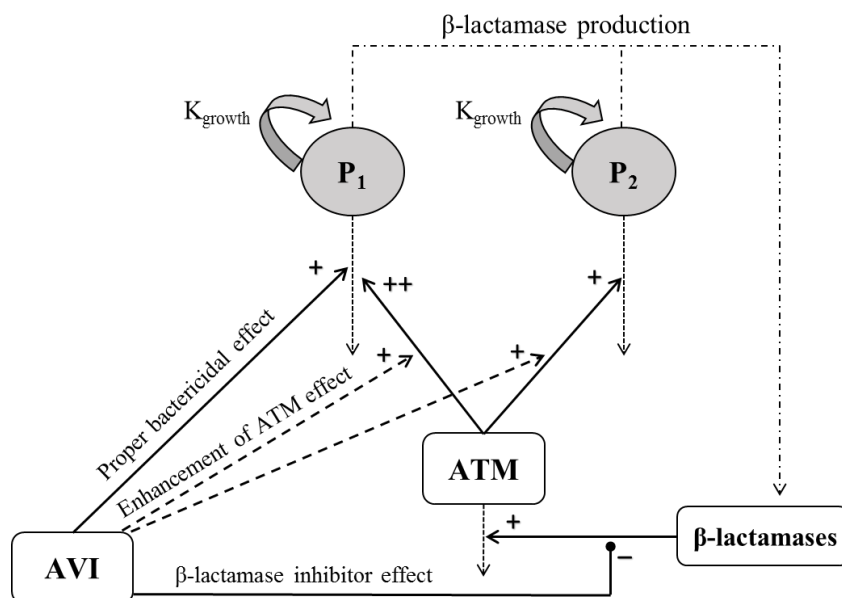


Figure IV.5. Schematic representation of the final model used to characterize ATM-AVI killing effect on drug-susceptible (P_1) and less-susceptible (P_2) bacteria. The model also included ATM degradation due to β -lactamases and its inhibition by AVI.

ATM bactericidal activity was characterized by a sigmoidal E_{max} model and AVI enhancing effect was modeled as a decrease of ATM EC_{50} with increasing AVI concentrations using a bi-exponential function (2), except for *E. coli* 1266865 for which a mono-exponential function better described the interaction between AVI concentration and ATM EC_{50} . The ATM-AVI interaction can be evaluated on the basis of α and β values. At the same AVI concentrations, high α and β values result in an important decrease in ATM EC_{50} , and thus an increase in ATM potency. Between the strains investigated, *E. coli* 1266865 showed the lowest α value ($\alpha = 0.42$ L/mg), meaning that higher AVI concentrations are necessary to observe the same decay in ATM EC_{50} as the other strains ($\alpha = 25.9 - 42.3$ L/mg). In the present model, an increasing factor (P_2 factor, **Table IV.2**) was used to describe ATM activity on P_2 subpopulation. EC_{50} values for the less-susceptible subpopulation were around 8 to 29

times higher than those estimated for the susceptible one. So, regrowth was explained by a higher EC_{50} for P_2 subpopulation instead of implementing a delay function as previously reported (2).

Another sigmoidal E_{max} model was used to describe the bactericidal activity of AVI observed in all strains. For *E. coli* 1266865 and *E. cloacae* 1318536, large values were predicted for the Hill coefficient ($\phi = 12.9$ and 8.91 , respectively) and consequently, AVI effect could be described as an all-or-none response. Thus, no AVI bactericidal activity was observed at concentrations lower than the predicted EC_{50} and, at levels above the EC_{50} , AVI showed almost maximum bactericidal activity (**Figure IV.1-4**, top panels B). No AVI effect was assumed on the P_2 subpopulation, since the EC_{50} values predicted by the model were much greater than the highest AVI concentrations used in the static-kill studies (32 - 64 mg/L) and were estimated with low precision.

Like in the reference model, ATM degradation rate was proportional to ATM concentration and depended on bacterial counts (P_1+P_2) but, in the present model, the bacterial counts impacted on ATM degradation according to an exponential function instead of an E_{max} model. The prevention of degradation by AVI was modeled according to a fractional inhibitory E_{max} model as described elsewhere (3, 8). Very low AVI concentrations were sufficient to prevent ATM degradation as showed by the low estimated IC_{50} values (**Table IV.2**). Drug degradation model was not incorporated for *E. coli* 1266865 strain since none was observed (**Figure IV.1**, bottom panels A and C).

Table IV.2. Parameter estimates for the PK-PD model based on four *Enterobacteriaceae* strains static time-kill kinetics and ATM degradation.

Parameter	Description	Estimate (RSE%)			
		<i>E. coli</i> 1266865	<i>C. freundii</i> 974673	<i>E. cloacae</i> 1285905	<i>E. cloacae</i> 1318536
Structural model					
Nmax (log ₁₀ cfu/mL)	maximum bacterial population size supported by the system	8.44 (0.27)	8.44 (0.27)	8.44 (0.27)	8.44 (0.27)
INOC (log ₁₀ cfu/mL)	bacterial count at t=0	6.01 (0.39)	6.01 (0.39)	6.01 (0.39)	6.01 (0.39)
P ₂ fraction	fraction of less sensitive subpopulation (P ₂) present at t=0	0.00001 fix	0.00001 fix	0.00002 fix	0.0000001 fix
K _{growth} (h ⁻¹)	bacterial growth rate constant	0.907 (5.43)	1.1 (3.64)	1.15 (2.86)	1.24 (1.23)
E _{max,ATM} (h ⁻¹)	maximum kill rate constant associated to ATM	2.62 (5.1)	1.76 (3.1)	1.6 (2.3)	1.86 (1.7)
A (mg/L)	first parameter of bi-exponential function to characterize ATM EC ₅₀ in monotherapy	31.8 (11.5)	99.1 (6.8)	2.94 (7.7)	67.9 (3.3)
B (mg/L)	second parameter of bi-exponential function to characterize ATM EC ₅₀ in monotherapy	0 fix	0.494 (6.5)	0.241 (6.7)	0.402 (5.7)
α (L/mg)	exponential constant associated with A parameter that describes the relationship between AVI concentration and ATM potency	0.42 (1.5)	37.2 (1.2)	25.9 (3.1)	42.3 (2.8)
β (L/mg)	exponential constant associated with B parameter that describes the relationship between AVI concentration and ATM potency	0 fix	0.548 (1.8)	0.602 (3.4)	0.412 (5.8)
γ	Hill coefficient that determined the steepness of the slope of the sigmoidal E _{max} curve associated with ATM bactericidal effect	1.48 (8.1)	1.42 (5.6)	2.65 (7.0)	1.52 (3.7)
P ₂ factor	EC ₅₀ increasing factor for the less sensitive subpopulation	8.09 (5.7)	9.39 (4.2)	18 (7.2)	29.1 (4.2)
E _{max,AVI} (h ⁻¹)	maximum kill rate constant associated to AVI	2.28 (2.0)	1.29 (7.1)	1.69 (7.0)	2.14 (4.3)
EC _{50,AVI} (mg/L)	concentration of AVI that achieves half of the maximum kill rate for P ₁	14.5 (2.8)	17.3 (6.8)	14.8 (14.7)	12 (5.1)
φ	Hill coefficient that described the steepness of the slope of the sigmoidal E _{max} curve associated with AVI bactericidal effect	12.9 (29.5)	4.63 (15.1)	2.1 (15.3)	8.91 (22.9)
Deg _{max} (h ⁻¹)	maximum degradation rate constant of ATM	-	0.00462 (8.9)	0.000129 (2.9)	0.000166 (2.7)

ψ (mL/cfu)	exponential constant associated with $\text{Deg}_{\max}$ that describes the relationship between the bacterial density (P_1+P_2) and ATM degradation	-	0.563 (2.2)	1 fix	1 fix
IC_{50} (mg/L)	AVI concentration corresponding to a 50% decrease in ATM degradation rate	-	0.0000213 (48.4)	0.000185 (22.0)	0.0128 (8.3)
ϕ	Hill coefficient that described the steepness of the slope of the sigmoidal $E_{\max}$ model for inhibition of ATM degradation by AVI	-	0.207 (6.5)	0.522 (6.9)	1.48 (5.9)
Residual variability					
additive error for bacterial counts ($\log_{10}$ cfu/mL)	additive residual error that accounts to the difference between the observed values and model-predicted values for bacterial counts	0.97 (2.8)	0.708 (2.2)	0.845 (2.8)	0.782 (2.1)
proportional error for ATM concentrations (%)	proportional residual error that accounts to the difference between the observed values and model-predicted values for ATM concentrations	10.1 (3.8)	49.4 (3.6)	24.4 (4.1)	33.3 (3.4)
RSE – Relative standard error					

Simulations

The final model was used to simulate bacterial counts and ATM concentrations over time, by taking into account ATM bactericidal effect and each of the three different effects of AVI separately, against the four investigated strains. The individual contribution of each AVI effect, during simulated static time-kill studies, is shown for each strain in **Figure IV.6-9**. For all strains investigated, at a constant concentration of 25 mg/L of ATM and 4.5 mg/L of AVI, simulations based on the full model, i.e. with all effects taken into account, predicted bacterial killing and no ATM degradation. The inhibitory effect of 4.5 mg/L AVI was predicted to prevent ATM degradation whatever the strain, except *C. freundii* for which ATM concentration was predicted to be 50% decreased at 24 h (**Figure IV.7**, bottom panel). However, this inhibitory effect did not prevent bacterial growth. When only ATM + AVI bactericidal effects were considered, bacterial growth was also predicted for all strains. According to the simulations, the effect that explained the combination efficacy was AVI enhancing effect which by itself yielded a similar bacterial killing to the one obtained with the full model.

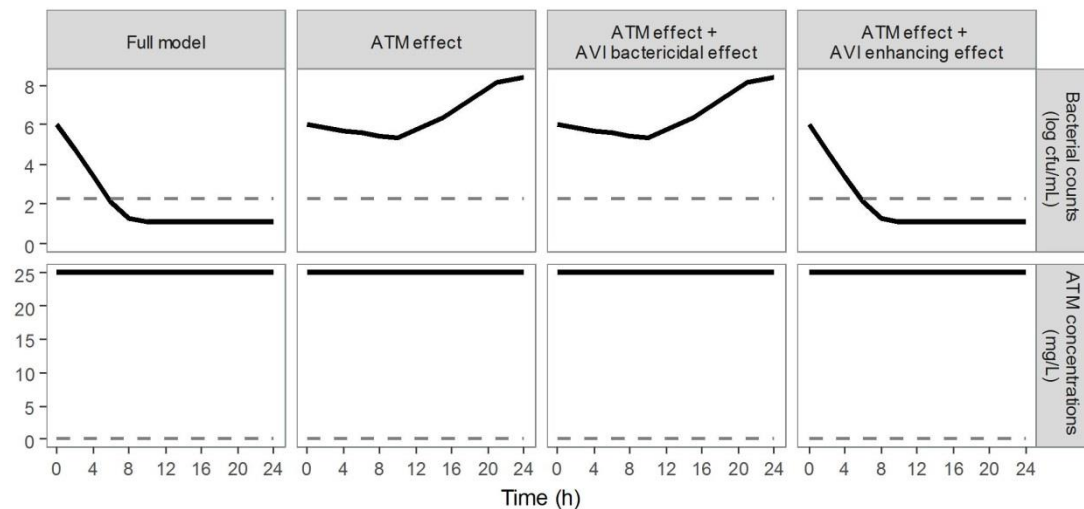


Figure IV.6. Simulations of the different effects of AVI on bacterial counts (top panels) and ATM degradation (bottom panels) in *E. coli* 1266865 in response to constant concentrations of 25-4.5 mg/L ATM-AVI. Dashed lines correspond to the limits of quantification.

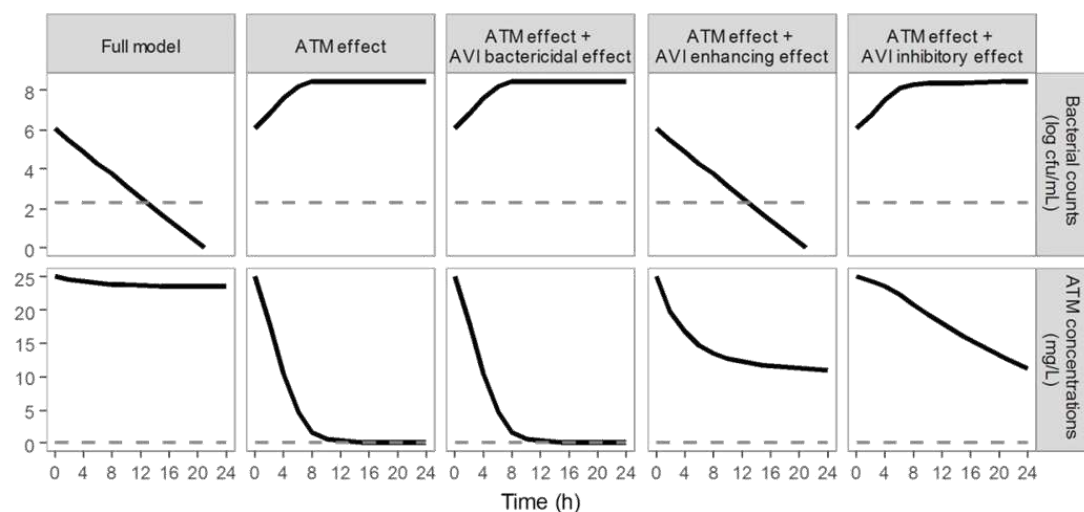


Figure IV.7. Simulations of the different effects of AVI on bacterial counts (top panels) and ATM degradation (bottom panels) in *C. freundii* 974673 in response to constant concentrations of 25-4.5 mg/L ATM-AVI. Dashed lines correspond to the limits of quantification.

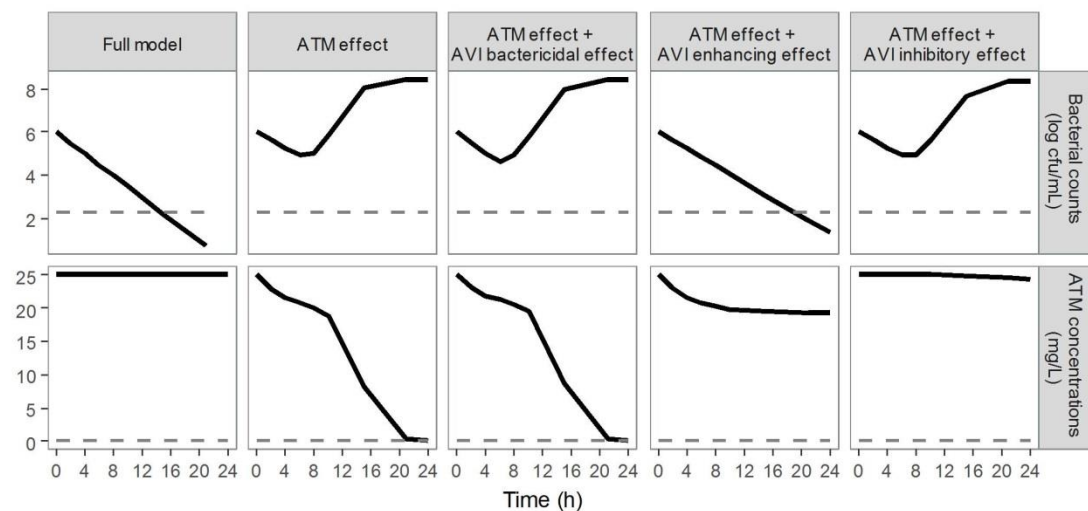


Figure IV.8. Simulations of the different effects of AVI on bacterial counts (top panels) and ATM degradation (bottom panels) in *E. cloacae* 1285905 in response to constant concentrations of 25-4.5 mg/L ATM-AVI. Dashed lines correspond to the limits of quantification.

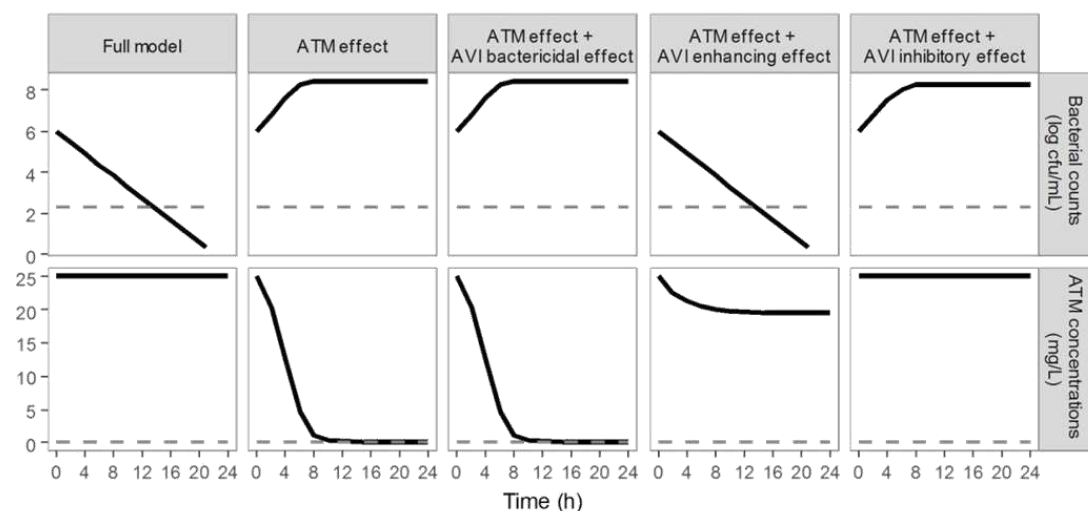


Figure IV.9. Simulations of the different effects of AVI on bacterial counts (top panels) and ATM degradation (bottom panels) in *E. cloacae* 1318536 in response to constant concentrations of 25-4.5 mg/L ATM-AVI. Dashed lines correspond to the limits of quantification.

The different effects of AVI were also assessed at low and high ATM (5 and 125 mg/L, respectively) and AVI (0.9 and 22.5 mg/L, respectively) concentrations, that can be obtained in clinical practice when dosed every 8 h at 2 g and 0.5 g, respectively, for *E. cloacae* 1285905 and *E. cloacae* 1318536, respectively (**Figures IV.10-11**). The figures for *E. coli* 1266865 and *C. freundii* 974673 strains can be found in **Supplementary Figures S11-S12**. At low AVI levels, a bactericidal effect similar to that predicted with the full model was solely simulated with the AVI enhancing effect (**Figures IV.10-11**, top panels), as it was observed at average concentrations. At high concentrations, AVI enhancing effect remained predominant for three strains out of four, but the bactericidal effects of ATM and AVI also contributed to total effect. Whatever the strain, the inhibitory effect of AVI poorly contributed to total effect (ATM effect + AVI inhibitory effect resulted in bacterial response similar to that for ATM alone).

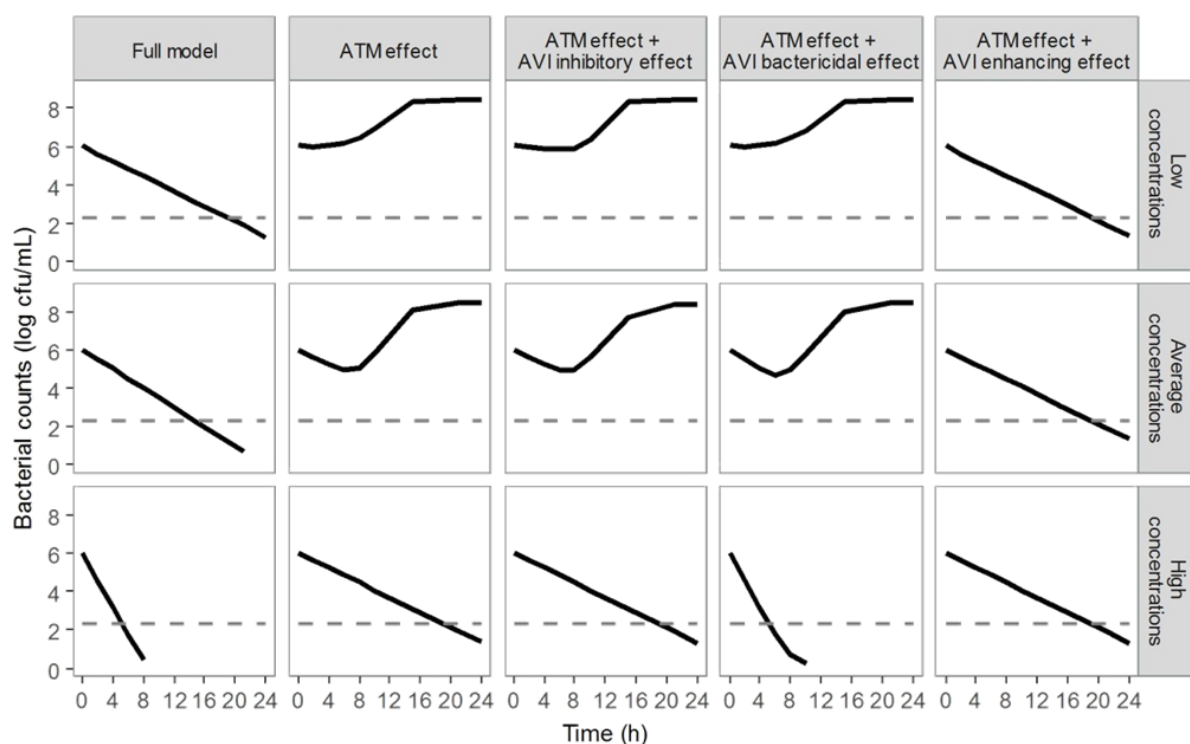


Figure IV.10. Simulations of the different effects of AVI on bacterial counts in *E. cloacae* 1285905 in response to different constant concentrations of ATM-AVI: low (5-0.9 mg/L), average (25-4.5 mg/L) and high (125-22.5 mg/L) concentrations. Dashed lines correspond to the limits of quantification.

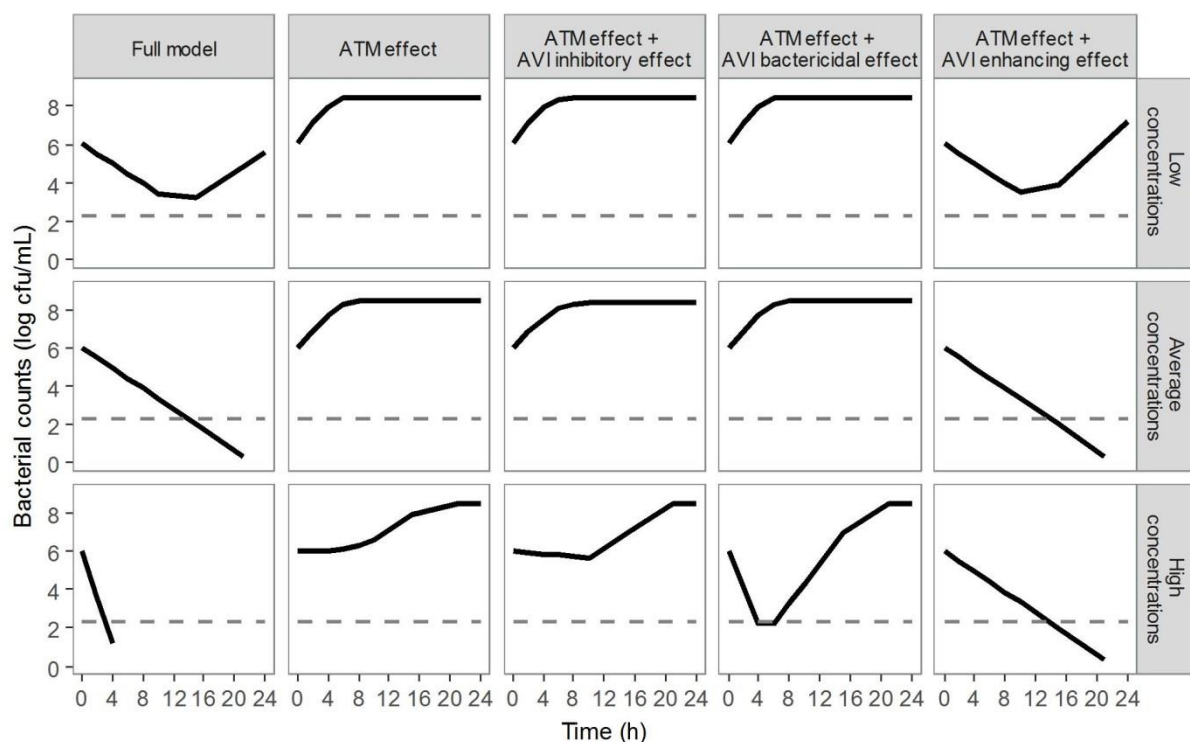


Figure IV.11. Simulations of the different effects of AVI on bacterial counts in *E. cloacae* 1318536 in response to different constant concentrations of ATM-AVI: low (5-0.9 mg/L), average (25-4.5 mg/L) and high (125-22.5 mg/L) concentrations. Dashed lines correspond to the limits of quantification.

DISCUSSION

Drug interactions can be complex and a more complete understanding of the PK-PD relationship of both drugs is crucial for optimizing drug combination dosing regimen (9). Semi-mechanistic PK-PD models are promising tools to quantify drug interactions, and in this context, a PK-PD model previously developed for ATM-AVI combination (2) could be extended for the four additional MDR *Enterobacteriaceae* evaluated in this study. The strains were chosen due to their ATM resistance, β -lactamase profiles - all strains producing metallo- β -lactamases such as NDM-1 and NDM-5 - and for being from different species of those previously studied.

To better characterize our data, slight modifications were made on the original model: both subpopulations were assumed to grow actively and ATM to exhibit bactericidal effect also on the less susceptible subpopulation with a higher EC_{50} . In doing this, there was no need for a delay function to explain regrowth. Moreover, ATM degradation was modeled according

to an exponential function instead of an $E_{\max}$ model and the prevention of ATM degradation was related to AVI concentrations. This could be explained by the fact that, in our study, lower AVI concentrations were used in combination and not only high AVI levels that could prevent the whole degradation. In this way, the relationship between AVI levels and the degree of ATM degradation could be characterized as performed for ceftazidime-avibactam (3).

β -lactamase inhibition by AVI was evaluated indirectly by monitoring the time-course of ATM concentrations in the presence and absence of AVI. Similar to what was reported by Sy and colleagues (7), in the absence of AVI, no ATM degradation was observed in the time-kill study for the *E. coli* isolate, despite the differences between β -lactamases expressed by these isolates (**Figure IV.1**, bottom panels A and C). As expected, for the other strains, AVI could prevent ATM degradation even at very low concentrations consistent with its very high efficacy (4).

Surprisingly, although AVI is a potent β -lactamase inhibitor, our model simulations suggested that this effect was not the most important to explain bacterial killing. In fact, at an average concentration of ATM of 25 mg/L (**Figures IV.6-9**), when only AVI inhibitory effect was taken into account and ATM degradation was totally prevented for most strains, ATM concentrations were not high enough to yield bacterial killing. Indeed, ATM concentrations were still lower than EC_{50} s of ATM in monotherapy (EC_{50} s either for the susceptible or less susceptible subpopulation). Therefore, keeping ATM concentrations stable thanks to β -lactamases inhibition was not sufficient to explain bacterial killing observed when ATM was combined with AVI.

Besides the β -lactamase inhibitory effect, AVI shows intrinsic bactericidal activity at higher concentrations (10) due to inhibition of PBP2 (5). MIC values for AVI alone were around 16-32 mg/L for the four *Enterobacteriaceae* studied, consistent with previously reported values for others isolates (5, 10, 11). This effect affected bacterial counts only at high concentration (22.5 mg/L), which suggests that in clinical practice it would be marginal, since concentrations will rapidly decrease due to the short half-lives of both compounds ($t_{1/2}$ ATM = $t_{1/2}$ AVI = 2 h) (12, 13).

As described for other β -lactamase inhibitors belonging to the DBO class, a third effect could be characterized for AVI which is the capability to enhance ATM activity.

Although AVI is not considered a potent β -lactam enhancer (4, 14), this effect was shown to be the most important to achieve full bacterial eradication according to the simulations performed in the present study (**Figure IV.6-11**). The enhancement of the activity of ATM by AVI occurs due to the simultaneous binding to different PBPs in the bacterial membrane (4, 15). ATM targets PBP3 (16) while AVI binds to PBP2 (5). Similar findings were observed when AVI was combined with ceftazidime (3), a β -lactam that also targets PBP3 (17). This AVI mechanism of action, successfully implemented in the model, confirms the recent results from Sutaria et al. suggesting that when combining two β -lactams, or a β -lactam with a β -lactamase inhibitor that has affinity for PBPs, it is important to consider their respective affinity for PBPs and the relative expression of PBPs (15). Differently to what was observed for AVI combined with ceftazidime against an *E. coli* strain (4), the enhancing effect could be observed even at low and clinically attainable concentrations (**Figures IV.10-11**). This enhancing effect was characterized in the model by a dramatic decrease of ATM EC₅₀ in the presence of clinically achievable AVI concentrations, restoring the susceptibility of the four different strains to ATM. This effect can be particularly apprehended with the *E. coli* strain, for which no hydrolysis of ATM was observed but whose ATM MIC decreased from 32 to 4 mg/L in the presence of 4 mg/L of AVI. Moreover, it should be noted that by enhancing ATM efficacy, this effect decreased bacterial counts and thus reduced ATM hydrolysis by β -lactamases.

Knowing that AVI has three distinct effects - β -lactamases inhibition, bactericidal activity and enhancement of ATM activity - and the last one being the major contributor for the final combined effect at least during time-kill studies, dosing regimens should be optimized in order to achieve the maximum interaction. Today, the majority of dosing regimens for β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations are chosen assuming that the only effect of the β -lactamase inhibitor is to prevent β -lactam degradation, and thus the combination is chosen mainly based on the β -lactamases expressed by pathogens. The findings of the present study suggest that β -lactamase inhibitors belonging to the DBO class should rather be chosen based on its pharmacological synergy with the β -lactam, and particularly, as suggested by Sutaria et al. (15), on their respective affinity for PBPs.

Nevertheless, this study has its limitations: the model and consequently the simulations were based on static concentrations time-kill curves. Therefore, the bacterial response to varying concentrations should be further investigated in a hollow-fiber infection

model (HFIM) in order to validate the PK-PD model and then evaluate the contribution of each AVI effect based on simulations of human PK profiles. Furthermore, it is important to keep in mind that semi-mechanistic models are simplifications of the biological processes and do not predict with accuracy what will occur in patients but still are informative tools that enables the integration of all available data to explore the complex interaction between drug combinations.

In conclusion, the semi-mechanistic PK-PD model slightly different from the previous published (2) could well characterize the three reported effects of AVI for the four additional MDR *Enterobacteriaceae* used in this study. On top of that, in the present study, the individual contribution of each AVI effect to the combined activity with ATM was evaluated. Within the clinical range of ATM-AVI concentrations, even though AVI demonstrated high efficiency to prevent ATM hydrolysis, the combined bactericidal activity was mostly explained by AVI enhancing effect. This suggests that, in the choice of a β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination, the synergy between the β -lactamase inhibitor and the β -lactam should be also considered in addition to the spectrum of β -lactamases covered by the β -lactamase inhibitor.

FUNDING

This research project was funded by the Innovative Medicine Initiative Joint undertaking under COMBACTE-CARE grant agreement 115620 resources of which are composed of financial contribution from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) and European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA) companies in kind contribution. Avibactam dry powder was provided by Pfizer.

ACKNOWLEDGMENTS

Part of this research was presented at the 28th European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21 to 24 April 2018, Madrid, Spain. We thank Emma Marquizeau for her technical assistance with the time-kill curve experiments.

CONFLICT OF INTEREST

Boudewijn de Jonge is currently an employee of Pfizer.

REFERENCES

1. Biedenbach DJ, Kazmierczak K, Bouchillon SK, Sahm DF, Bradford PA. 2015. In vitro activity of aztreonam-avibactam against a global collection of Gram-negative pathogens from 2012 and 2013. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4239-48.
2. Sy S, Zhuang L, Xia H, Beaudoin ME, Schuck VJ, Derendorf H. 2017. Prediction of in vivo and in vitro infection model results using a semimechanistic model of avibactam and aztreonam combination against multidrug resistant organisms. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 6:197-207.
3. Sy SKB, Zhuang L, Xia H, Beaudoin ME, Schuck VJ, Nichols WW, Derendorf H. 2018. A mathematical model-based analysis of the time-kill kinetics of ceftazidime/avibactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* doi:10.1093/jac/dkx537.
4. Morinaka A, Tsutsumi Y, Yamada M, Suzuki K, Watanabe T, Abe T, Furuuchi T, Inamura S, Sakamaki Y, Mitsunashi N, Ida T, Livermore DM. 2015. OP0595, a new diazabicyclooctane: mode of action as a serine beta-lactamase inhibitor, antibiotic and beta-lactam 'enhancer'. *J Antimicrob Chemother* 70:2779-86.
5. Asli A, Brouillette E, Krause KM, Nichols WW, Malouin F. 2016. Distinctive Binding of Avibactam to Penicillin-Binding Proteins of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 60:752-6.
6. The European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). 2018. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 8.0.
7. Sy SK, Beaudoin ME, Zhuang L, Loblein KI, Lux C, Kissel M, Tremmel R, Frank C, Strasser S, Heuberger JA, Mulder MB, Schuck VJ, Derendorf H. 2016. In vitro pharmacokinetics/pharmacodynamics of the combination of avibactam and aztreonam against MDR organisms. *J Antimicrob Chemother* 71:1866-80.
8. Sy SKB, Derendorf H. 2017. Experimental design and modelling approach to evaluate efficacy of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Clin Microbiol Infect* doi:10.1016/j.cmi.2017.07.020.
9. Brill MJE, Kristoffersson AN, Zhao C, Nielsen EI, Friberg LE. 2017. Semi-mechanistic pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antibiotic drug combinations. *Clin Microbiol Infect* doi:10.1016/j.cmi.2017.11.023.
10. Lagace-Wiens PR, Tailor F, Simner P, DeCorby M, Karlowsky JA, Walkty A, Hoban DJ, Zhanel GG. 2011. Activity of NXL104 in combination with beta-lactams against genetically characterized *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing class A extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2434-7.

11. Berkhout J, Melchers MJ, van Mil AC, Nichols WW, Mouton JW. 2015. In vitro activity of ceftazidime-avibactam combination in in vitro checkerboard assays. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1138-44.
12. Ramsey C, MacGowan AP. 2016. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam. *J Antimicrob Chemother* 71:2704-12.
13. Merdjan H, Rangaraju M, Tarral A. 2015. Safety and pharmacokinetics of single and multiple ascending doses of avibactam alone and in combination with ceftazidime in healthy male volunteers: results of two randomized, placebo-controlled studies. *Clin Drug Investig* 35:307-17.
14. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Woodford N. 2016. Interactions of OP0595, a Novel Triple-Action Diazabicyclooctane, with beta-Lactams against OP0595-Resistant Enterobacteriaceae Mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 60:554-60.
15. Sutaria DS, Moya B, Green KB, Kim TH, Tao X, Jiao Y, Louie A, Drusano GL, Bulitta JB. 2018. First Penicillin-Binding Protein Occupancy Patterns of beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
16. Georgopapadakou NH, Smith SA, Sykes RB. 1982. Mode of action of azthreonam. *Antimicrob Agents Chemother* 21:950-6.
17. Hayes MV, Orr DC. 1983. Mode of action of ceftazidime: affinity for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 12:119-26.
18. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2003. EUCAST Discussion Document E. Dis 5.1: determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin Microbiol Infect* 9:1-7.
19. Vinks AA, van Rossem RN, Mathot RA, Heijerman HG, Mouton JW. 2007. Pharmacokinetics of aztreonam in healthy subjects and patients with cystic fibrosis and evaluation of dose-exposure relationships using monte carlo simulation. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3049-55.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Drug stability analysis

Actual concentrations of ATM and AVI in the media during the time-kill experiments were measured by LC-MS/MS in order to monitor ATM and AVI degradation. Combined calibration standards ranging from 0.025-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ATM) and from 0.0025-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (AVI) were prepared by serial dilution of ATM and AVI stock solutions in CAMHB. A 10 μL aliquot of each standard level and also of each sample from the time-kill experiments was diluted in 90 μL of water/acetonitrile/formic acid (95/5/0.1, v/v/v) containing [$^2\text{H}_6$]-aztreonam and [$^{13}\text{C}_5$, ^{15}N]-avibactam as internal standards. Samples were then directly injected onto LC-MS/MS. The system included a Shimadzu high-performance liquid chromatography (HPLC) system module (Shimadzu Nexera XR, Marne la Vallée, France) coupled with an API 3500 mass spectrometer (Sciex, Les Ulis, France). ATM and AVI were analyzed on an ACE 3 C18-AR (50 x 4.6 mm, 3 μm). The mobile phase A consisted of water with 0.1% formic acid and mobile phase B was acetonitrile with 0.1% formic acid. A gradient program was used in a constant flow rate of 0.3 mL.min^{-1} , starting with a composition of 90% mobile phase A and 10% B. The initial condition was kept for 0.5 min and then, the fraction of mobile phase B was increased to 40 % within 1.5 min. Thereafter, the ratio changed in 0.5 min to 5 % A and 95 % B. This ratio was held constant for 1 min before the initial composition was restored within 0.5 min, and kept constant until run stop at 6 minutes. Electrospray ionization in negative mode was used for the detection of ATM and AVI. Ions were analyzed in the multiple reaction monitoring (MRM), and the following transitions were inspected: m/z 433.9 $\rightarrow$ 95.9 for ATM, m/z 440.0 $\rightarrow$ 96 for its deuterated internal standard and m/z 264.0 $\rightarrow$ 95.8 for AVI and m/z 270.1 $\rightarrow$ 95.8 for AVI labelled internal standard. Intraday variability was characterized at four concentration levels (200, 2, 0.05 and 0.025 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for ATM; 10, 0.1, 0.005 and 0.0025 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for AVI) with a precision and bias of < 15% for both compounds ($n = 5$ per molecule). Corresponding between-day variability was determined with a precision and a bias of < 15% ($n = 10$).

Static time-kill studies

The static time-kill profiles and ATM degradation during the experiment are showed in **Figures S1-S4** for *E. coli* 1266865, *C. freundii* 974673, *E. cloacae* 1285905 and *E. cloacae*

1318536, respectively. Top panels represent bacterial counts over time according to ATM concentrations (listed on the panel strip) and AVI concentrations (separated by different colors and symbols). Bottom panels showing the corresponding percentage of ATM remaining in the system are matched by ATM concentration for the bacteria dynamics in the top graphs.

Pharmacodynamic model

A logistic growth model (1, 2) was used to describe the *in vitro* bacterial population dynamics, and the structural model for the bacterial population included two subpopulations of bacteria: P1 (susceptible subpopulation) and P2 (less susceptible subpopulation). The logistic growth model was modified to incorporate the ATM and AVI bactericidal activity represented by two different sigmoidal E_{max} models such that:

$$\frac{dP1}{dt} = \left[k_{growth} \left(1 - \frac{P_1 + P_2}{N_{max}} \right) \right] P_1 - \left[\frac{E_{max,ATM} \cdot ATM^\gamma}{EC_{50,ATM}^\gamma + ATM^\gamma} + \frac{E_{max,AVI} \cdot AVI^\phi}{EC_{50,AVI}^\phi + AVI^\phi} \right] P_1 \quad (1)$$

$$\frac{dP2}{dt} = \left[k_{growth} \left(1 - \frac{P_1 + P_2}{N_{max}} \right) \right] P_2 - \left[\frac{E_{max,ATM} \cdot ATM^\gamma}{(EC_{50,ATM}^\gamma \times P2 \text{ factor}) + ATM^\gamma} \right] P_2 \quad (2)$$

Where P_1 (cfu/mL) is the susceptible bacteria subpopulation number density, P_2 (cfu/mL) the less susceptible bacteria subpopulation number density (corresponding to a fraction of P_1 at $t = 0$, the P_2 fraction), N_{max} (cfu/mL) the maximum population size that is supported by the environment, k_{growth} the natural growth rate constants for P_1 and P_2 subpopulations, ATM (mg/L) the drug concentration at any specific time, $E_{max,ATM}$ (h^{-1}) referring to the maximum kill rate due to ATM, $EC_{50,ATM}$ (mg/L) the half-maximal effective concentration of ATM for P_1 , P_2 factor the increasing factor for determination of the EC_{50} for P_2 subpopulation (with P_2 factor > 1 , then $EC_{50,ATM} < EC_{50,ATM} \times P_2$ factor), γ the Hill coefficient that characterizes the steepness of the ATM sigmoid E_{max} curve for P_1 and P_2 subpopulation, $E_{max,AVI}$ (h^{-1}) referring to the maximum kill rate due to AVI, ϕ is the Hill coefficient describing the

steepness of the AVI sigmoid $E_{\max}$ curve for P1, and $EC_{50,AVI}$ (mg/L) is the concentration of AVI that achieves 50% of the maximum kill rate for P1 subpopulation.

As previously described (3), the enhancing effect of AVI was modelled as a decrease of ATM EC_{50} when AVI concentrations increase using a bi-exponential function of AVI concentration on ATM EC_{50} :

$$EC_{50,ATM} = Aexp^{-\alpha AVI} + Bexp^{-\beta AVI} \quad (3)$$

Where A and B ($\mu\text{g/mL}$) are model constants that added together corresponds to the ATM EC_{50} value when AVI concentration is zero; α and β ($\text{mL}/\mu\text{g}$) are exponential constants that describe the relationship between AVI concentration and ATM potency.

The time-course of ATM concentrations during the time-kill kinetic study were modelled in order to take into account the degradation of ATM by β -lactamases which is dependent on bacterial counts (P1+P2). The role of AVI is to protect ATM by inhibiting β -lactamases. As observed in previous studies (4, 5), increasing concentrations of AVI decreased the rate of ATM degradation and this concentration dependence was modelled using an inhibitory $E_{\max}$ model:

$$\frac{dATM}{dt} = -Deg_{\max} \cdot e^{[(P1+P2) \times \psi]} \times \left(1 - \frac{AVI^{\phi}}{IC_{50}^{\phi} + AVI^{\phi}}\right) \times ATM \quad (4)$$

Where $Deg_{\max}$ (mg/L/h) is the maximum degradation rate constant, ψ (mL/cfu) is the constant that describes the relationship between the bacterial counts (P1+P2) and ATM degradation, IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) referring to the concentration of AVI corresponding to a 50% decrease in the ATM degradation rate and ϕ is the Hill coefficient that characterizes the steepness of the sigmoidal $E_{\max}$ model for inhibition of ATM degradation by AVI.

The residual errors, the difference between the observed and model-predicted values at each time point, were additive on a log scale for bacteria counts ($\log_{10}$ cfu/mL) and proportional for ATM concentrations (mg/L). All analysis were conducted using NONMEM

7.4 with first-order conditional maximum likelihood with Laplacian numerical algorithm, the subroutine was ADVAN 9 with a TOL value set to 6. Model evaluation included graphical analysis of goodness of fit (GOF) plots (**Figures S5-S6**), relative standard errors (RSEs) (**Table IV.2**), visual predictive checks (VPCs) (**Figures S7-S10**).

Simulations

The final model (full model), containing ATM bactericidal effect (ATM E_{max} model), AVI bactericidal effect (AVI E_{max} model), AVI enhancing effect (decrease in ATM EC_{50}), ATM degradation and its inhibition by AVI (AVI inhibitory E_{max} model), was used to simulate bacterial counts and ATM concentrations over time.

Additionally, the final model was reduced and new simulations were conducted in order to evaluate the individual contribution of each AVI effect. Simplifications were made by removing from the differential equations the part describing a specific AVI effect. The simplest model evaluated was the one in which only ATM bactericidal effect was kept, then, accordingly with **Equation 3**, ATM EC_{50} in this model was:

$$EC_{50,ATM} = A + B \quad (5)$$

Equations 1 and **4** were also reduced by keeping only the sigmoidal E_{max} model that describes ATM killing and no inhibition of the degradation by AVI was considered:

$$\frac{dP_1}{dt} = \left[k_{growth} \left(1 - \frac{P_1 + P_2}{N_{max}} \right) \right] P_1 - \left[\frac{E_{max,ATM} \cdot ATM^\gamma}{EC_{50,ATM}^\gamma + ATM^\gamma} \right] P_1 \quad (6)$$

$$\frac{dATM}{dt} = -Deg_{max} \cdot e^{[(P_1+P_2) \times \psi]} \times ATM \quad (7)$$

The reduced model in which ATM bactericidal effect was combined only with AVI bactericidal effect was simulated based on **Equations 1, 5** and **7**. The model used to evaluate the contribution of AVI enhancing effect was reduced according to **Equations 3, 6** and **7**. In order to check the contribution of the inhibition of ATM degradation by AVI on the bacterial

killing, simulations were conducted with a model based on **Equations 4, 5 and 6. Equation 2** was kept in all models with no modifications.

All simulations of the different effects of AVI and ATM were conducted in response to different constant concentrations of ATM-AVI: high concentrations (125 and 22.5 mg/L, respectively), average concentrations (25 and 4.5 mg/L, respectively) and low concentrations (5 and 0.9 mg/L, respectively).

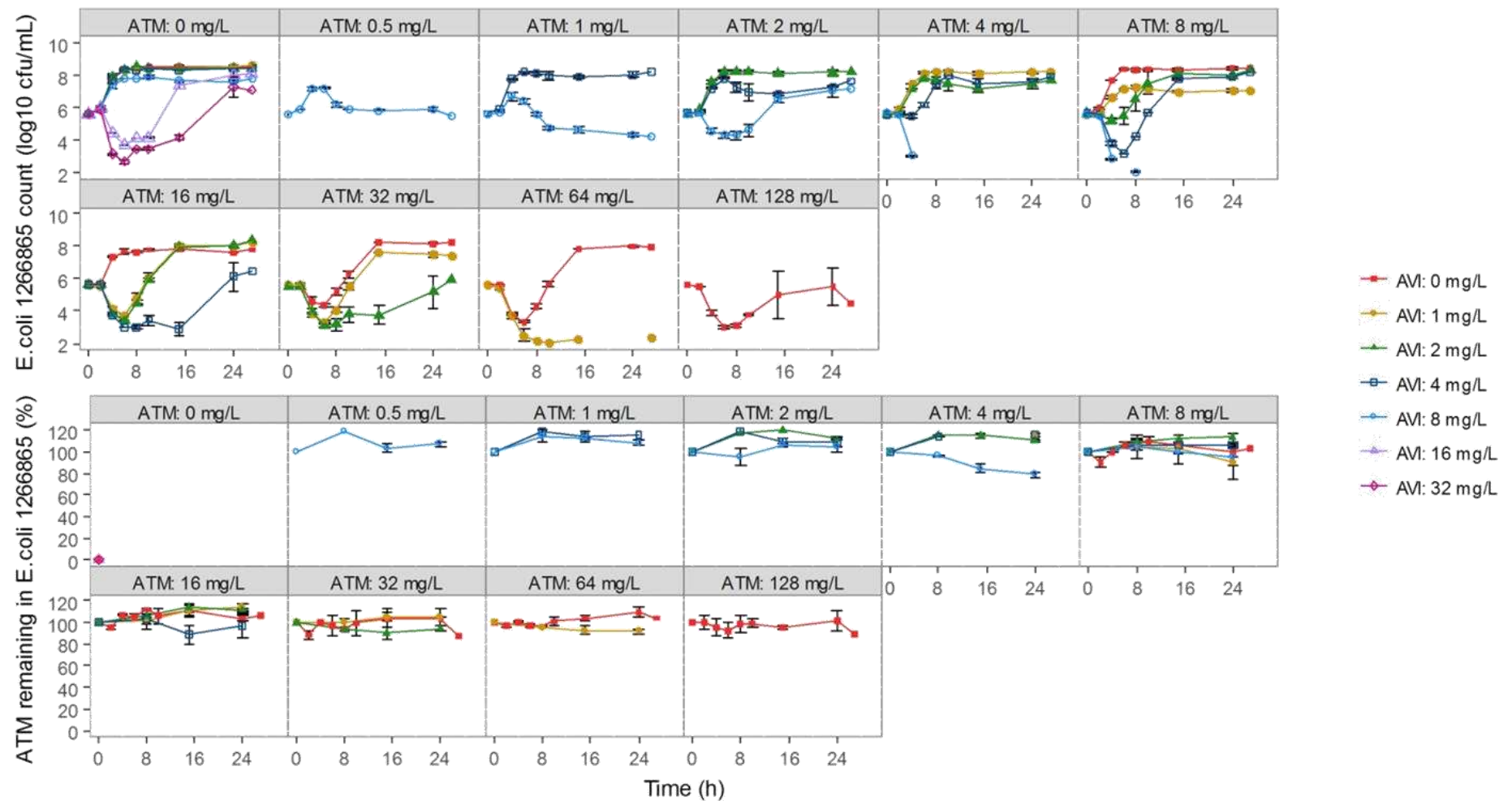


Figure S1. Observed static-time kill curves of ATM and AVI against *E. coli* 1266865 over 27 h (top panels) and the percentage of the initial ATM concentration remaining in the system during the time-kill experiments (bottom panels). Symbols represent means and error bars are standard errors.

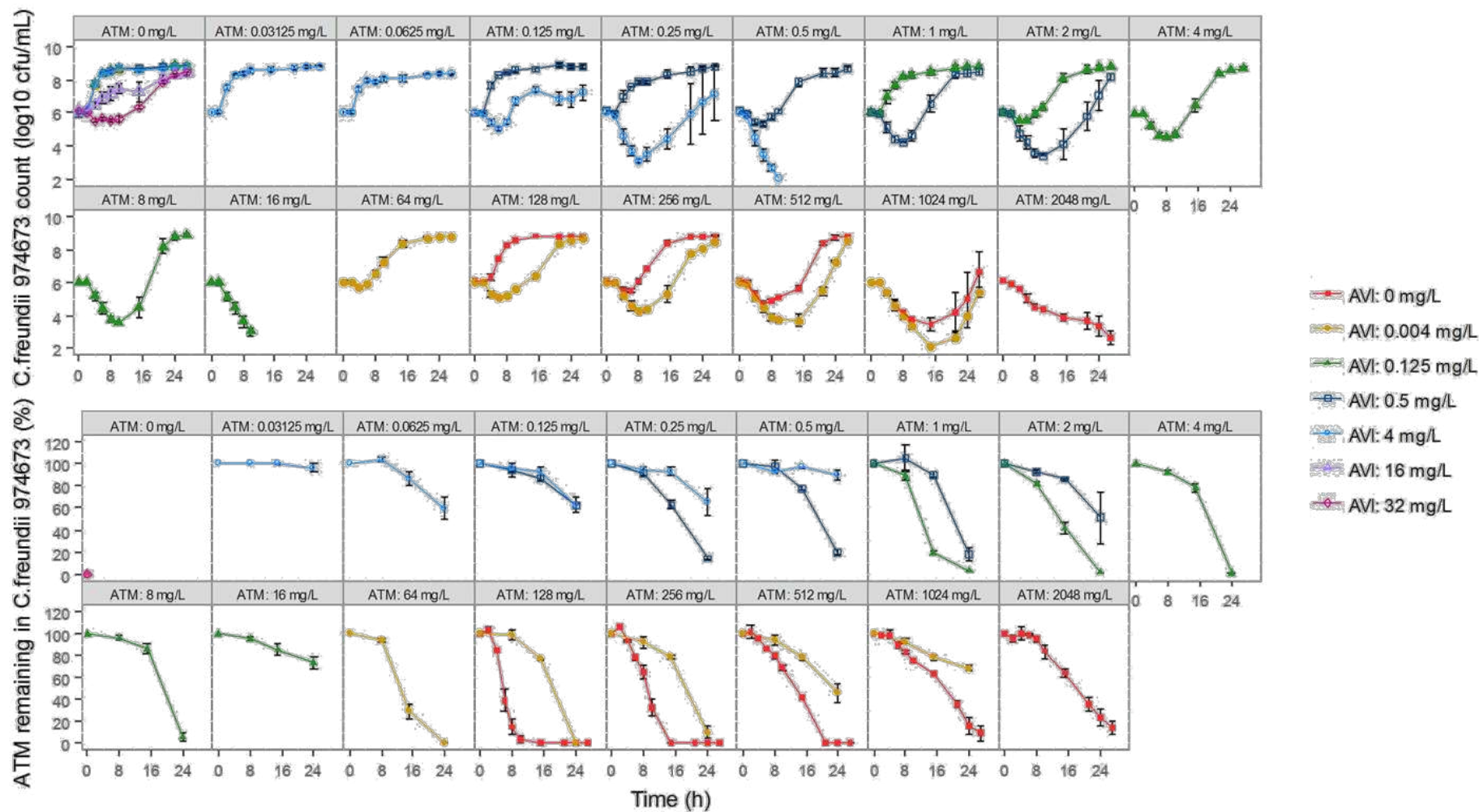


Figure S2. Observed static-time kill curves of ATM and AVI against *C. freundii* 974673 over 27 h (top panels) and the percentage of the initial ATM concentration remaining in the system during the time-kill experiments (bottom panels). Symbols represent means and error bars are standard errors.

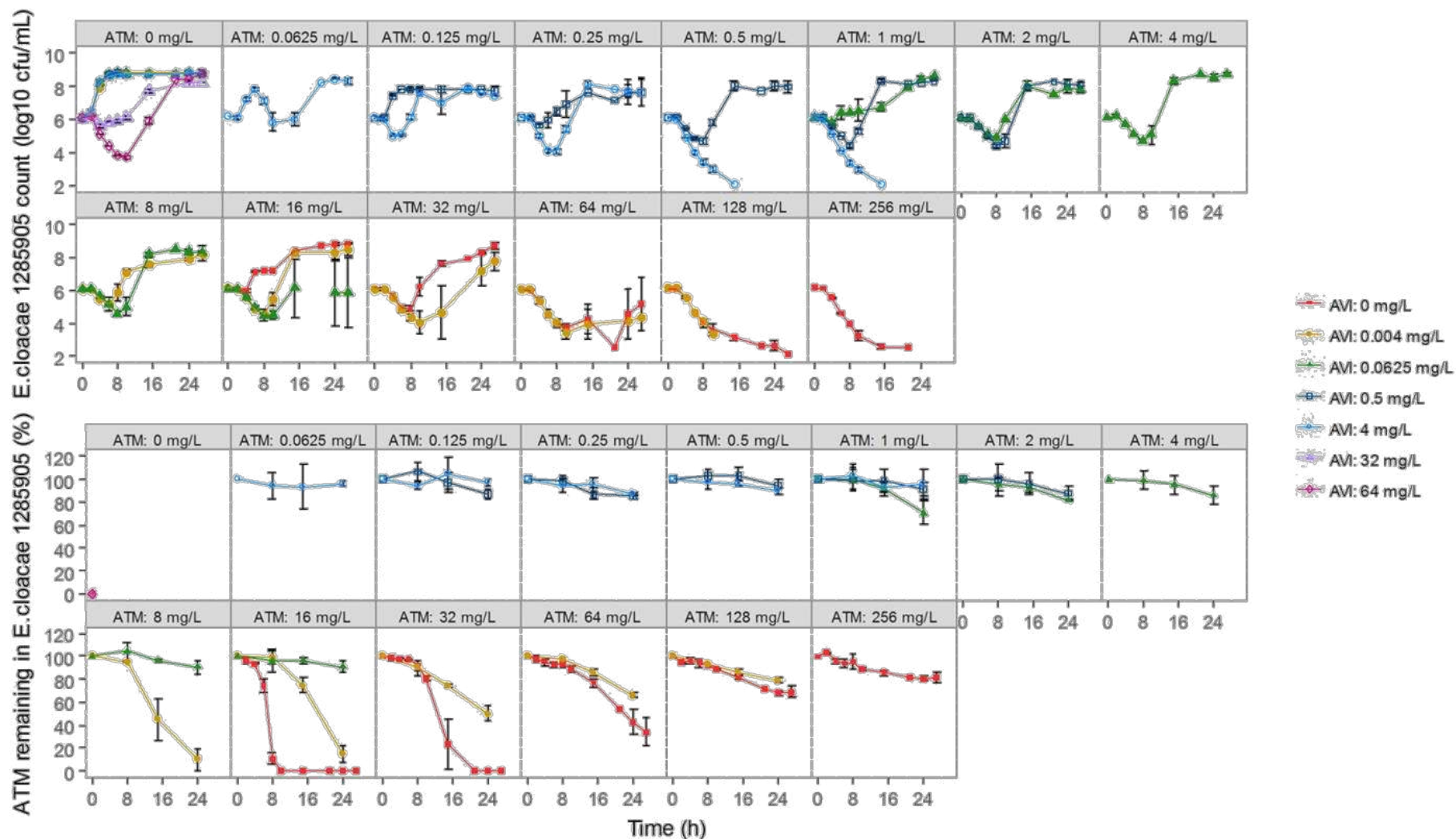


Figure S3. Observed static-time kill curves of ATM and AVI against *E. cloacae* 1285905 over 27 h (top panels) and the percentage of the initial ATM concentration remaining in the system during the time-kill experiments (bottom panels). Symbols represent means and error bars are standard errors.

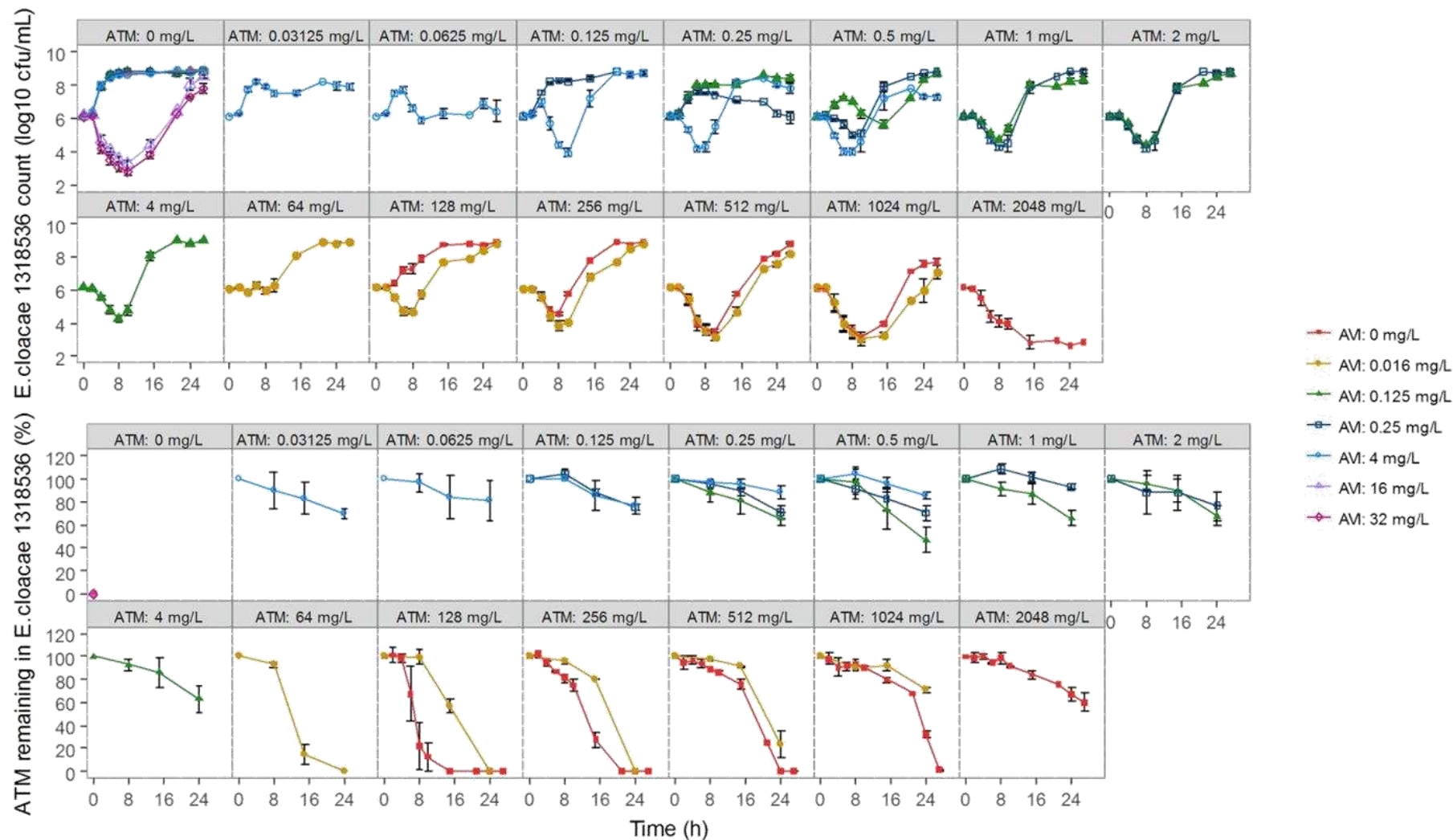


Figure S4. Observed static-time kill curves of ATM and AVI against *E. cloacae* 974673 over 27 h (top panels) and the percentage of the initial ATM concentration remaining in the system during the time-kill experiments (bottom panels). Symbols represent means and error bars are standard errors.

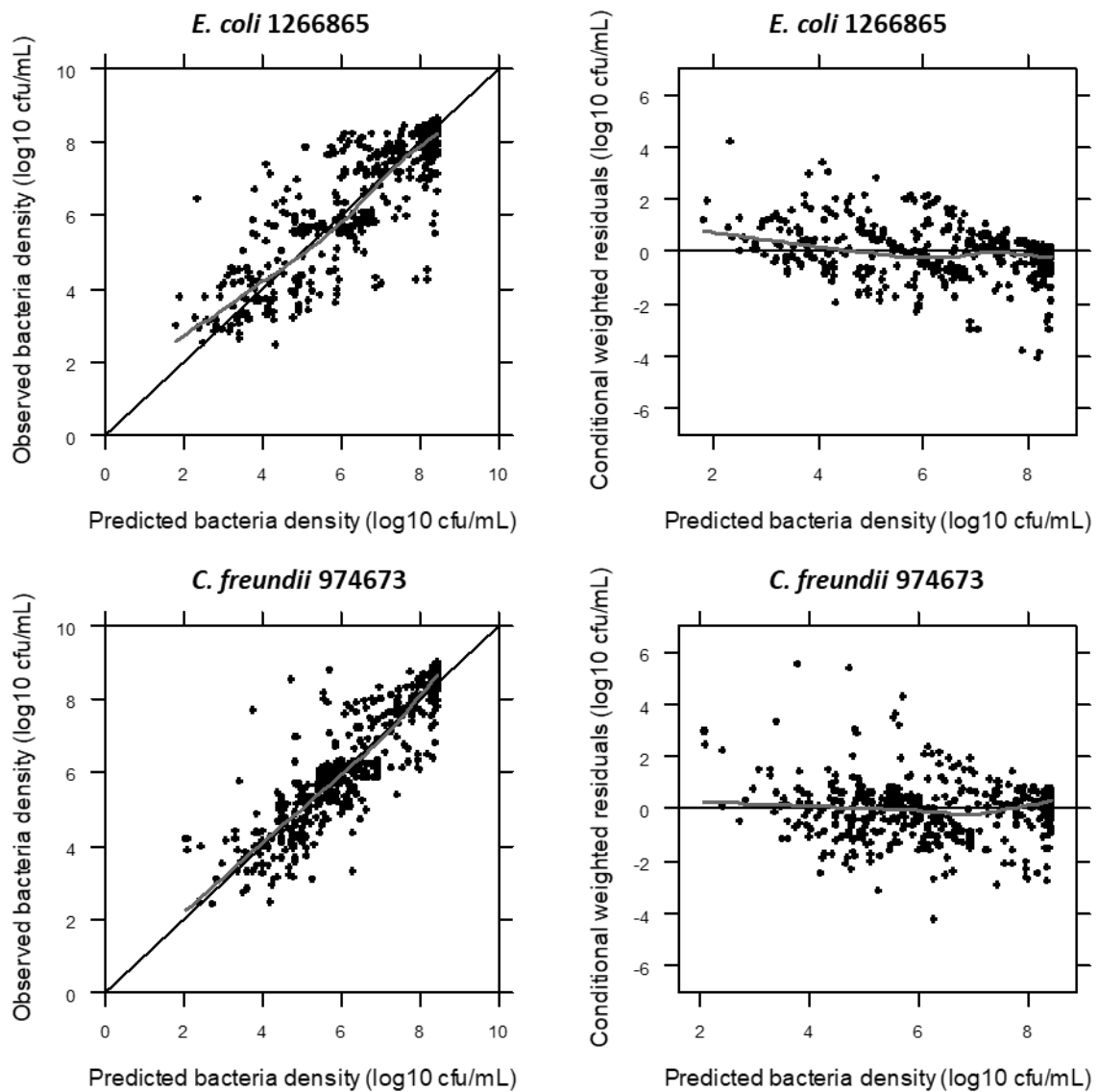


Figure S5: Goodness-of-fit plots for pharmacodynamics model of ATM-AVI combinations against *E. coli* 1266865 (top panels) and *C. freundii* 974673 (bottom panels). Left columns show the observed versus predicted bacterial density and the right columns the conditional weighted residuals versus predicted bacterial density.

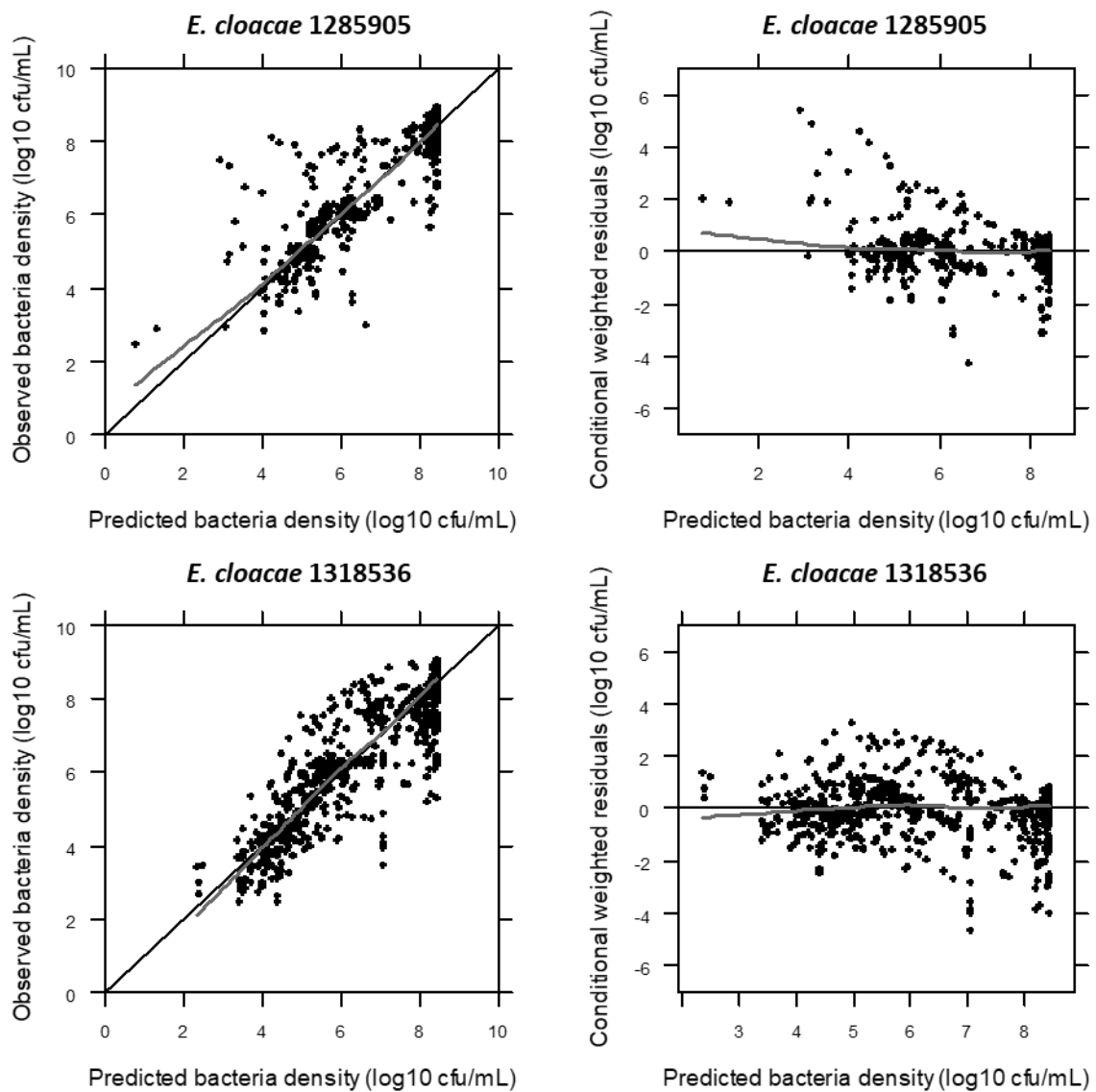


Figure S6: Goodness-of-fit plots for pharmacodynamics model of ATM-AVI combinations against *E. cloacae* 1285905 (top panels) and *E. cloacae* 1318536 (bottom panels). Left columns show the observed versus predicted bacterial density and the right columns the conditional weighted residuals versus predicted bacterial density.

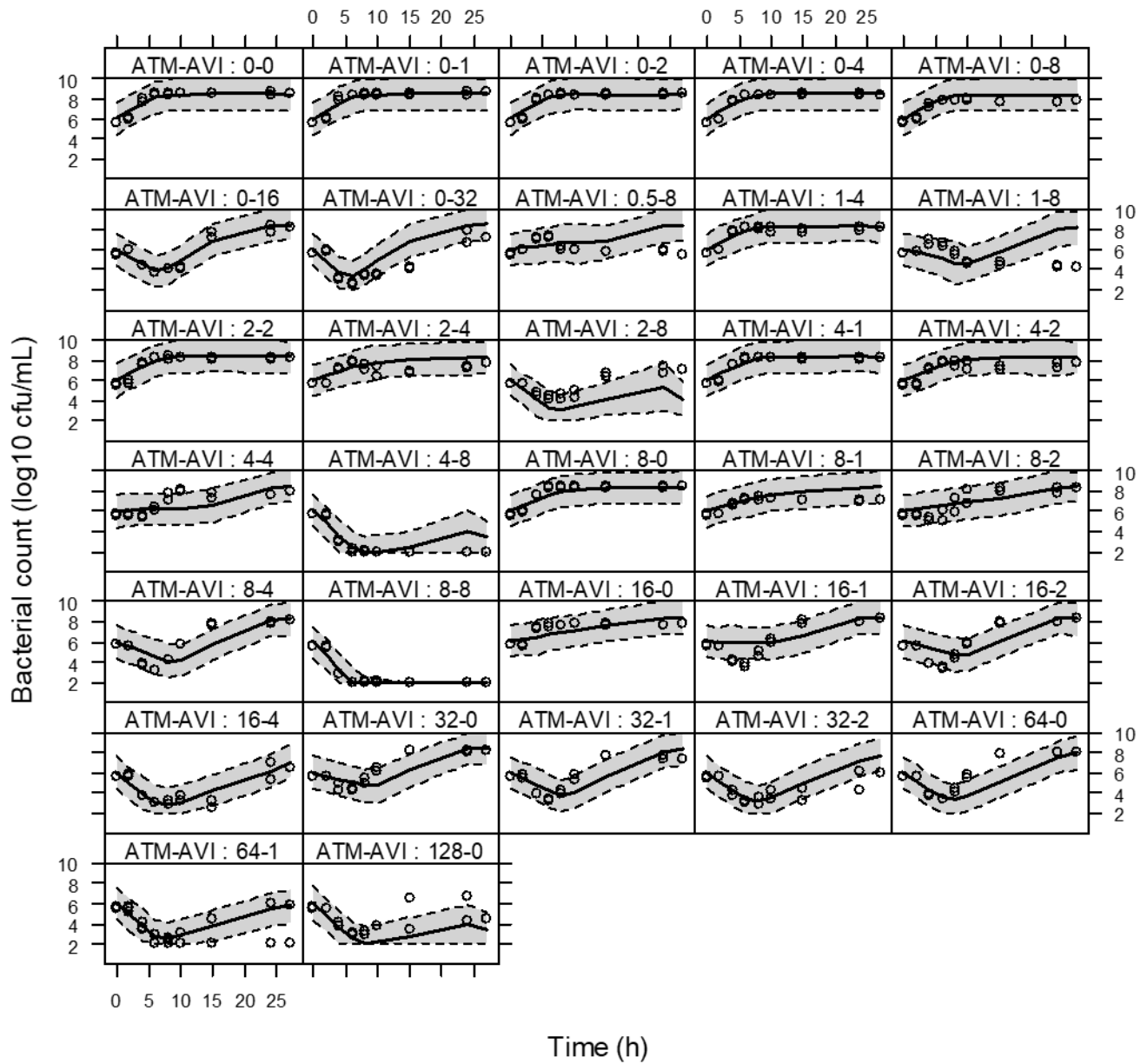


Figure S7: Visual predictive checks (VPCs) for pharmacodynamics model of ATM-AVI against *E. coli* 1266865. Observations (points), median of predictions (solid line) and 90% predictions intervals are shown.

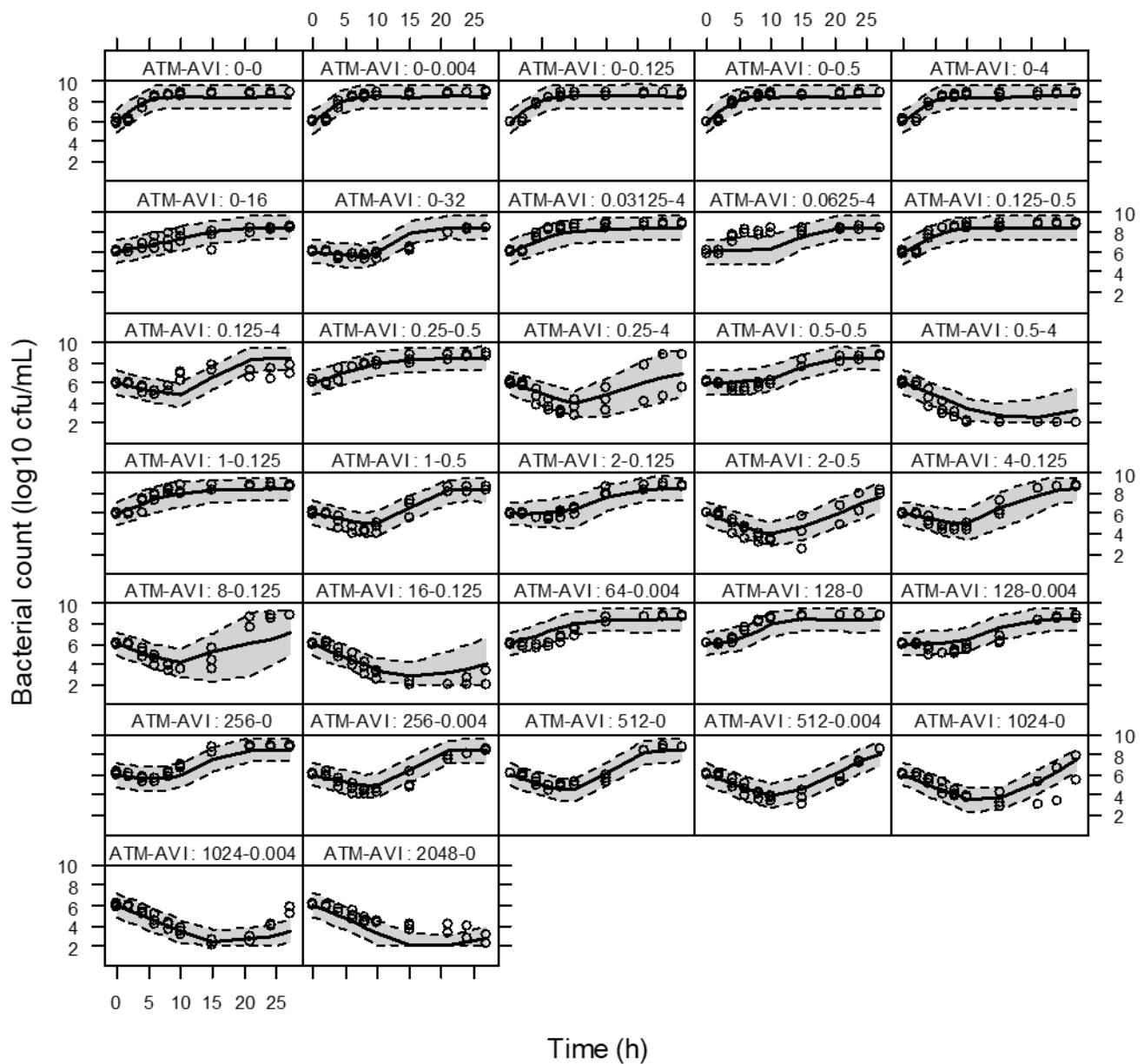


Figure S8: Visual predictive checks (VPCs) for pharmacodynamics model of ATM-AVI against *C. freundii* 974673. Observations (points), median of predictions (solid line) and 90% predictions intervals are shown.

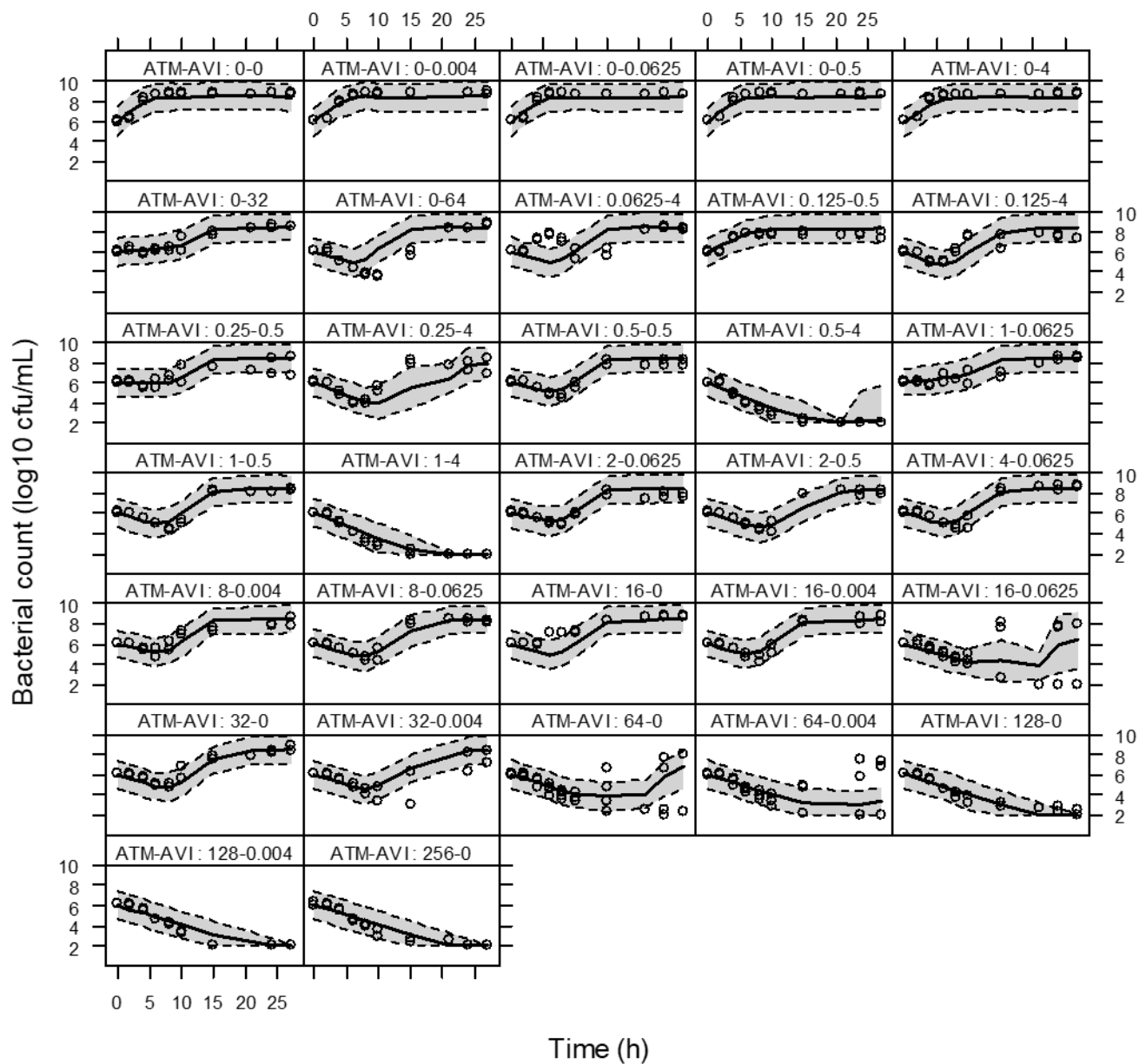


Figure S9: Visual predictive checks (VPCs) for pharmacodynamics model of ATM-AVI against *E. cloacae* 1285905. Observations (points), median of predictions (solid line) and 90% predictions intervals are shown.

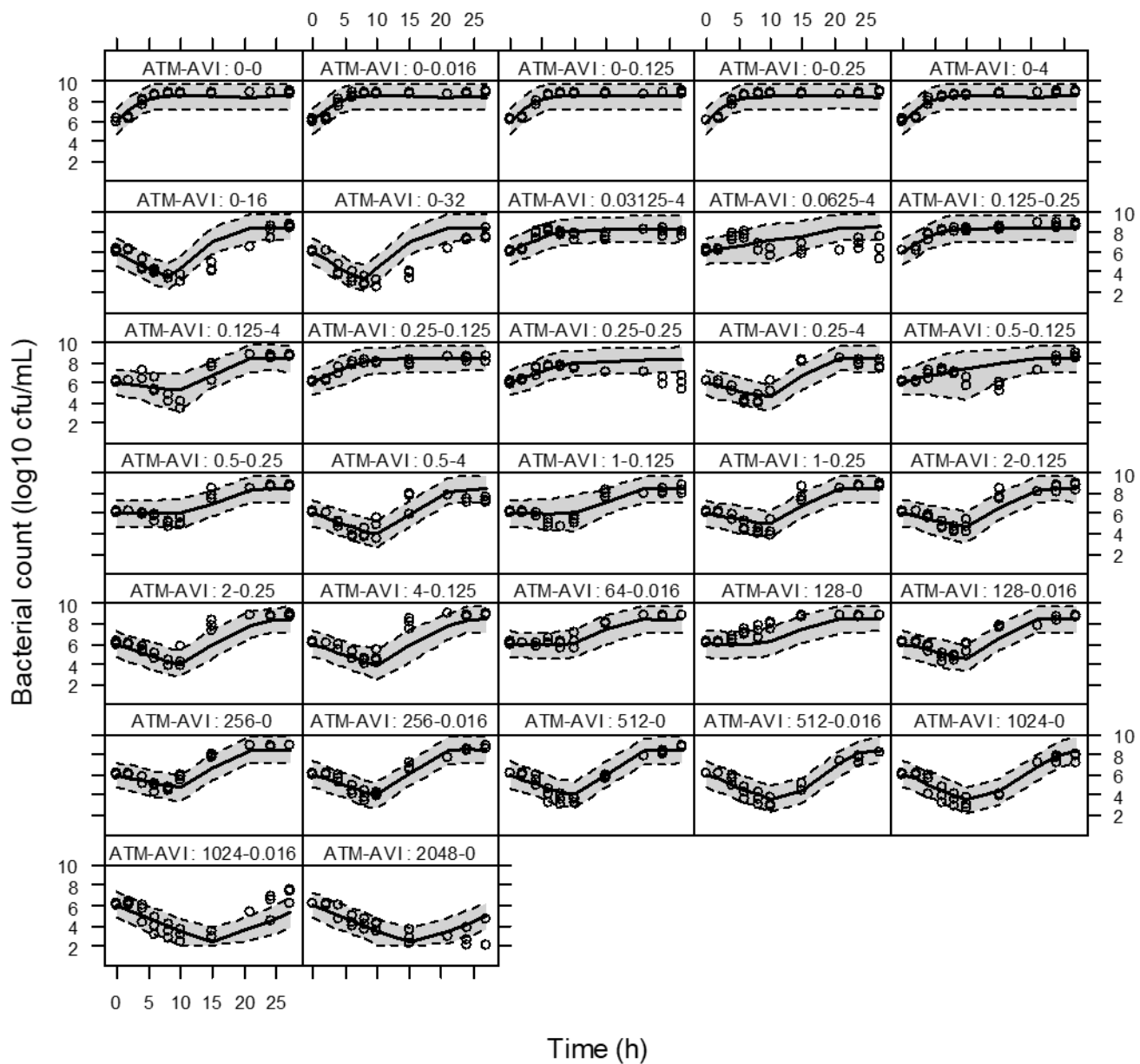


Figure S10: Visual predictive checks (VPCs) for pharmacodynamics model of ATM-AVI against *E. cloacae* 1318536. Observations (points), median of predictions (solid line) and 90% predictions intervals are shown.

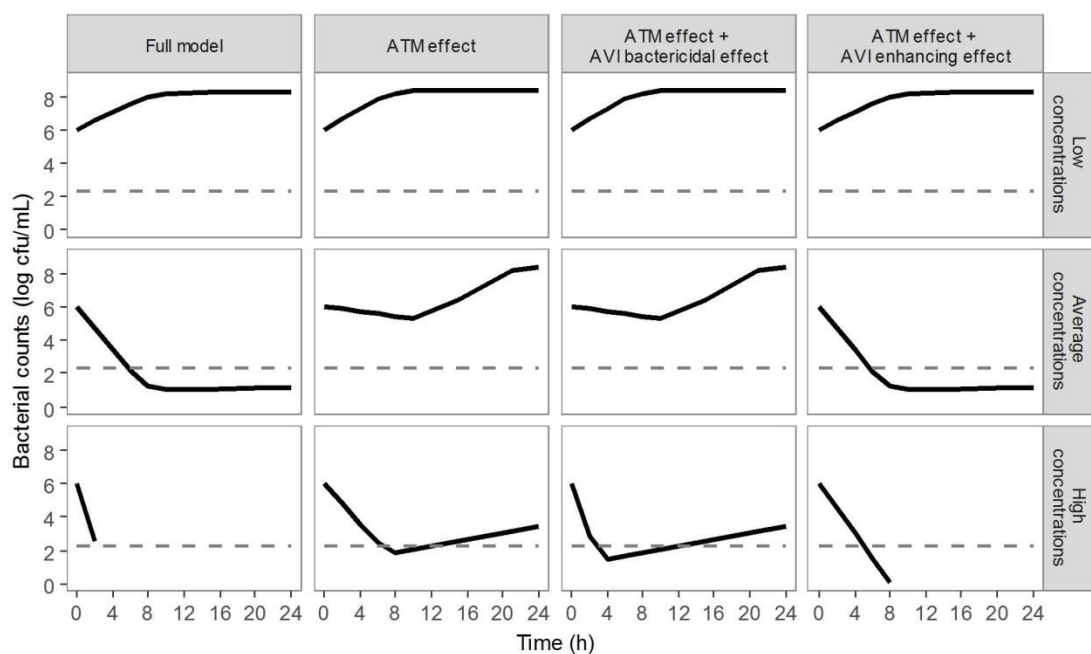


Figure S11. Simulations of the different effects of AVI on bacterial counts in *E. coli* 1266865 in response to different constant concentrations of ATM-AVI: low (5-0.9 mg/L), average (25-4.5 mg/L) and high (125-22.5 mg/L) concentrations. Dashed lines correspond to the limits of quantification.

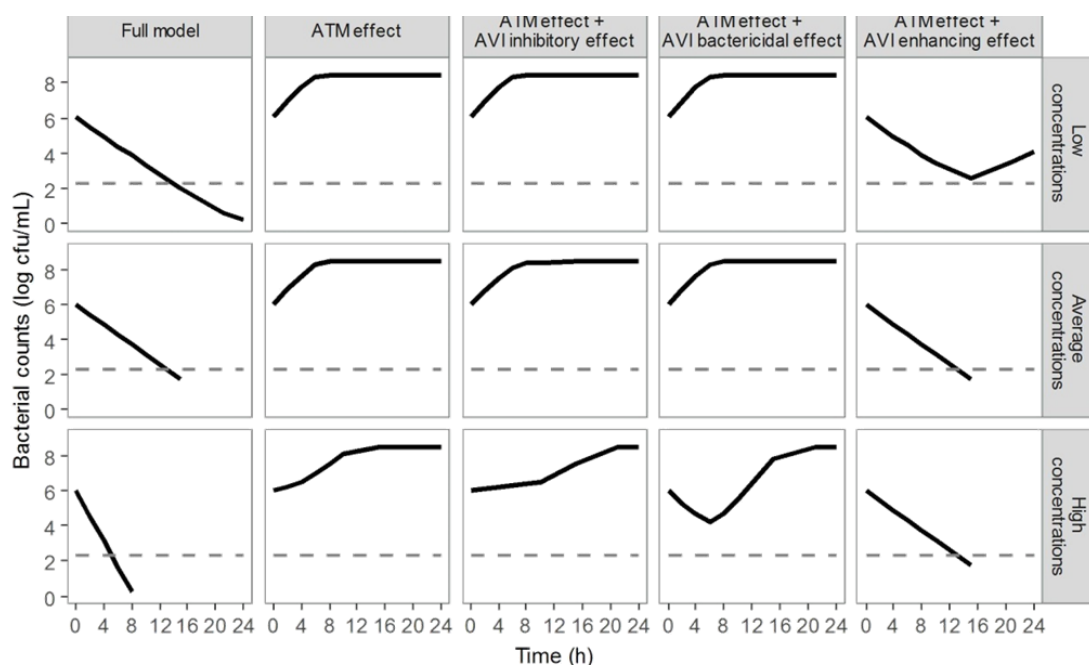


Figure S12. Simulations of the different effects of AVI on bacterial counts in *C. freundii* 974673 in response to different constant concentrations of ATM-AVI: low (5-0.9 mg/L), average (25-4.5 mg/L) and high (125-22.5 mg/L) concentrations. Dashed lines correspond to the limits of quantification.

REFERENCES

1. Nielsen EI, Friberg LE. 2013. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacol Rev* 65:1053-90.
2. Sy SKB, Derendorf H. 2014. Pharmacometrics in Bacterial Infections. 14:229-258.
3. Sy S, Zhuang L, Xia H, Beaudoin ME, Schuck VJ, Derendorf H. 2017. Prediction of in vivo and in vitro infection model results using a semimechanistic model of avibactam and aztreonam combination against multidrug resistant organisms. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 6:197-207.
4. Sy SKB, Derendorf H. 2017. Experimental design and modelling approach to evaluate efficacy of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Clin Microbiol Infect* doi:10.1016/j.cmi.2017.07.020.
5. Sy SKB, Zhuang L, Xia H, Beaudoin ME, Schuck VJ, Nichols WW, Derendorf H. 2018. A mathematical model-based analysis of the time-kill kinetics of ceftazidime/avibactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* doi:10.1093/jac/dkx537.

DISCUSSION

Les deux facteurs qui déterminent l'efficacité d'un antibiotique chez un patient donné sont sa PK et en particulier ses concentrations libres en fonction du temps au niveau du site infectieux, et sa PD c'est-à-dire la sensibilité des bactéries. Ainsi, la compréhension de la relation PK/PD d'un antibiotique est cruciale pour optimiser un schéma posologique et maximiser l'activité antimicrobienne tout en limitant la toxicité du traitement, mais aussi la sélection et le développement de résistances. Définir un schéma posologique approprié pour les associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases et plus généralement pour les associations d'antibiotiques peut s'avérer très complexe du fait des interactions qui peuvent exister entre les deux molécules aussi bien au niveau de la PK que de la PD. L'ensemble de nos travaux s'est concentré sur l'évaluation PK/PD de l'association ATM-AVI, nouvelle association en cours de développement, dans le cadre du projet européen « Innovative Medicines Initiative - Combacte-care ».

L'association ATM-AVI étant en cours de développement clinique pour le traitement des infections sévères à Gram négatif, en particulier les infections intra-abdominales compliquées, une étude de microdialyse a tout d'abord été menée afin d'évaluer la distribution de l'ATM-AVI au site d'infection de rats avec ou sans péritonite induite par une ligature et ponction caecale. L'Article II a montré que la distribution péritonéale et musculaire de l'ATM et de l'AVI était rapide à la fois chez les rats sains et les rats avec une péritonite, avec des profils de concentrations dans le sang, le muscle et le liquide intra-péritonéal quasiment superposés. L'absence de différence significative entre les aires sous la courbe des concentrations libres dans le sang et dans le liquide interstitiel des tissus suggère que l'ATM et l'AVI se distribuent de manière passive sans dégradation des molécules dans le compartiment périphérique, comme expliqué dans l'introduction au paragraphe 3. Par conséquent, les concentrations libres sanguines devraient refléter les concentrations libres au site infectieux et pourraient être utilisées pour prédire l'effet antibactérien. De plus, il a été montré que les paramètres PK des deux molécules n'étaient pas affectés par l'infection.

Les expérimentations chez les animaux ont l'avantage de permettre d'estimer l'effet de la pathologie sur la PK des molécules en incluant un groupe témoin, ce qui n'est pas envisageable en clinique. De plus, ce modèle de péritonite chez le rat est facilement

reproductible. Les expériences ont donc été menées sur des animaux homogènes, en termes de type de péritonite et de conditions physiologiques. Par comparaison, les patients ont souvent des infections d'origine variable et des pathologies associées, introduisant une grande variabilité inter-patients et donc une difficulté à montrer un lien entre la pathologie étudiée et des différences PK.

Il faut néanmoins rester prudent par rapport à l'extrapolation à la clinique des résultats de cette étude. Des études de microdialyse menées chez des patients de réanimation atteints de péritonite ont montré que des antibiotiques comme l'imipénème (216) et le méropénème (217) étaient dégradés dans le péritoine et que leurs concentrations dans le liquide péritonéal étaient par conséquent inférieures aux concentrations plasmatiques. Or ces résultats ne sont pas en accord avec ceux précédemment obtenus chez l'animal en utilisant la même approche méthodologique. En effet, comme pour l'ATM et l'AVI, les concentrations libres d'imipénème mesurées par microdialyse intrapéritonéale chez le rat étaient toujours quasi-identiques dans le sang et le liquide péritonéal, en présence ou non d'infection (218). Il a été mis en avant que ces discordances « Homme-rat » pouvaient être liées à une différence d'espèce (216) ou à un défaut de pertinence du modèle d'infection utilisé chez l'animal qui pourrait ne pas être représentatif des sepsis rencontrés en clinique (219). En effet, l'infection multi-bactérienne provoquée dans ce modèle validé et largement décrit utilisant une ligature et une ponction de caecum, est d'origine intestinale (220). Or chez le patient, les péritonites font également suite et sont souvent associées à une perforation ou à une nécrose du tractus œsophagien et/ou gastrique (221). Une libération plus ou moins importante du bol gastrique chargé d'acides et d'enzymes dans la cavité péritonéale des patients pourrait donc être associée à l'infection bactérienne et être responsable d'une dégradation de l'antibiotique plus importante que celle obtenue par libération du contenu du caecum chez le rat. De plus, ce modèle expérimental de péritonite ne permet pas d'évaluer la dégradation possible de l'ATM par les β -lactamases produites par les bactéries responsables de ce type d'infection. Une éventuelle dégradation de l'ATM et/ou de l'AVI dans le liquide péritonéal de patients n'est donc pas à exclure et mériterait d'être étudiée.

Ainsi, même si l'extrapolation à l'homme est discutable, les résultats de cette étude de microdialyse menée chez le rat constituent des données préliminaires concernant la distribution de l'ATM-AVI au niveau du site infectieux et permettront d'orienter les études futures.

La seconde partie de cette thèse a été menée afin d'étudier la PD de l'association ATM-AVI contre des souches d'*Enterobacteriaceae* productrices de diverses β -lactamases, et en particulier l'interaction PD entre ces deux agents. L'approche traditionnelle pour évaluer la relation PK/PD des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases repose sur la détermination d'un indice PK/PD pour chaque composé et, comme dans le cas des antibiotiques, sur la réalisation de simulations de Monte Carlo à partir d'un modèle PK de population, afin d'estimer la proportion de patients qui devrait atteindre les valeurs cibles pour chacun des deux indices PK/PD (PTA) (222). Pour l'association ATM-AVI (204), une première série d'études HF a été menée en faisant varier la dose totale et l'intervalle de dose de l'ATM de façon à simuler différents profils PK humains tout en maintenant la concentration d'AVI constante, à un niveau assurant une inhibition maximale des β -lactamases (i.e. 4 mg/L), afin d'évaluer si l'indice PK/PD de l'ATM changeait en présence d'AVI. Il a été montré que l'effet de l'ATM en association avec l'AVI était toujours lié à la fraction de l'intervalle de temps, sur une période de 24 h, pendant laquelle les concentrations libres d'ATM étaient supérieures à la CMI de l'ATM déterminée en présence de 4 mg/L d'AVI ($fT > CMI_{ATM-AVI}$) (**Figure 22**). Dans ces conditions, la valeur cible de $fT > CMI_{ATM-AVI}$ a été déterminée pour une diminution d'1 $\log_{10}$ du nombre de colonies après 24 h, considérée de manière arbitraire comme critère d'efficacité.

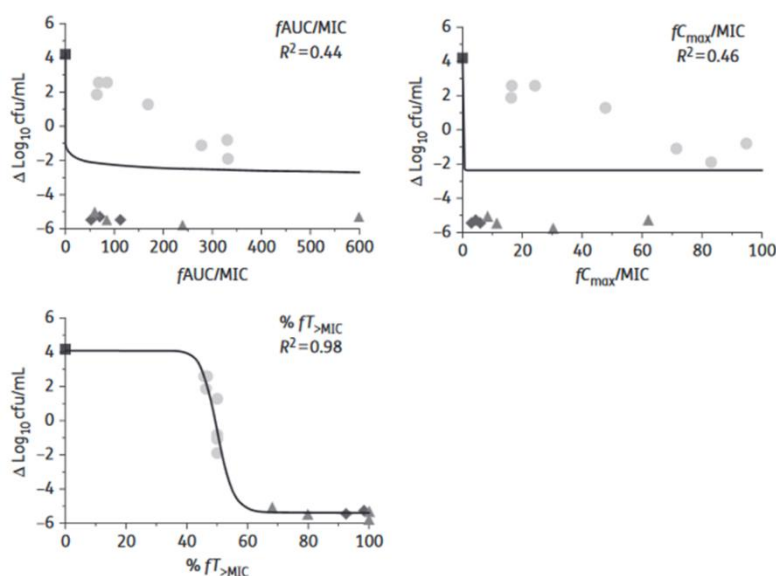


Figure 22. Relation entre les indices $fAUC/CMI$, fC_{max}/CMI et $\% fT > CMI$ de l'ATM en présence d'une perfusion constante de 4 mg/L d'AVI et le nombre de *Klebsiella pneumoniae* ARC3802 dans un modèle d'*hollow-fibers*. Les symboles représentent les données expérimentales et les lignes continues l'ajustement d'un modèle Emax sigmoïde. Les cercles, les triangles et les losanges correspondent à différentes fréquences d'administration : toutes les 24 h, toutes les 12h, toutes les 6h, respectivement. Les carrés représentent les contrôles (d'après Singh R, 2015 (204)).

Dans une seconde série d'études HF, en reproduisant un schéma posologique d'ATM permettant d'atteindre la cible PK/PD déterminée lors de la première série d'expériences, différents schémas posologiques d'AVI ont été simulés afin de déterminer quel indice PK/PD caractérisait le mieux la capacité de l'AVI à restaurer l'activité antimicrobienne de l'ATM. L'effet de l'AVI s'est avéré être également temps-dépendant et la concentration seuil inhibitrice au-dessus de laquelle les concentrations libres d'AVI devaient être maintenues le plus longtemps possible a été définie ($fT > C_T$) parmi une gamme de concentrations d'AVI comprise entre 0.5 et 4 mg/L, comme décrit précédemment dans l'introduction (paragraphe 4.3.2.). La concentration seuil d'AVI correspondant le mieux à son efficacité en association avec l'ATM était de 2 ou 2.5 mg/L selon la souche étudiée (**Figure 23**).

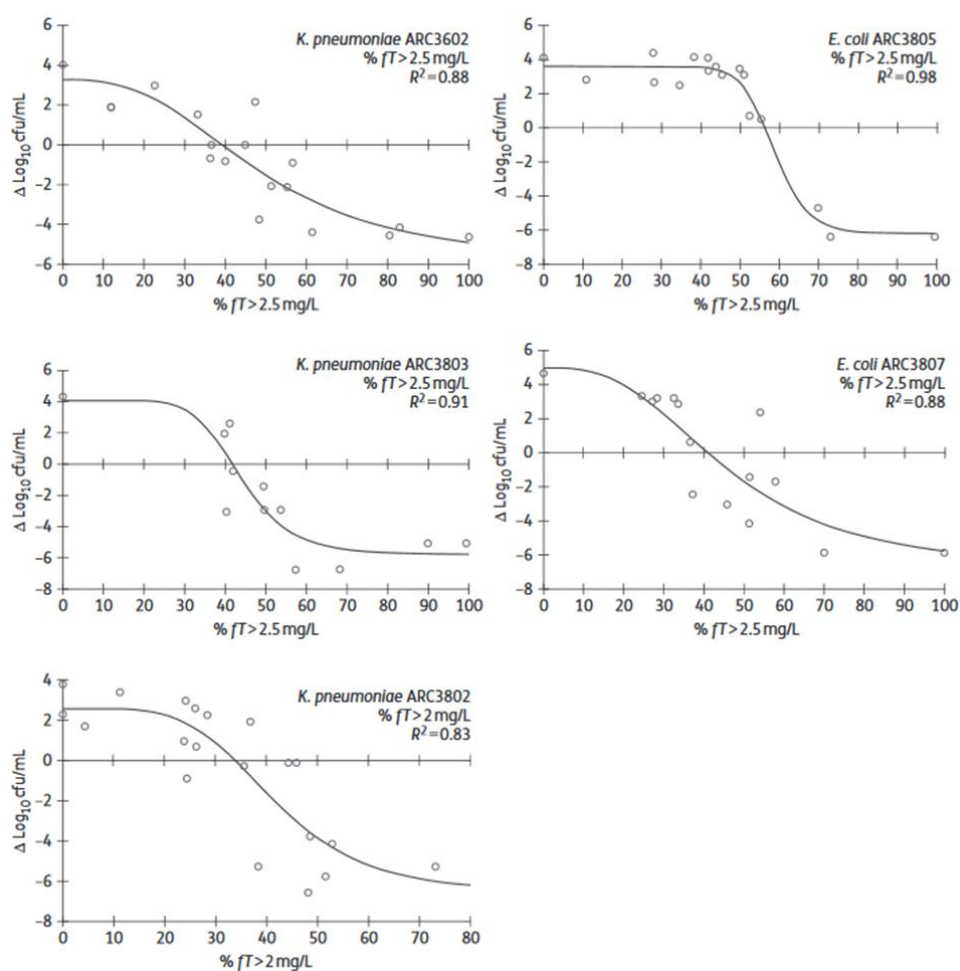


Figure 23. Relation entre le $\% fT > C_T$ de l'AVI en présence d'une dose fixe d'ATM et le nombre de différentes souches dans un modèle d'*hollow-fibers*. Les cercles représentent les données expérimentales et les lignes continues l'ajustement d'un modèle Emax sigmoïde (d'après Singh R, 2015 (204)).

Cette méthode conduit donc à l'établissement de deux cibles distinctes qui doivent être atteintes toutes les deux pour assurer le succès du traitement. Des cibles PK/PD correspondant à $60\% \text{ fT} > \text{CMI}_{\text{ATM-AVI}}$ pour l'ATM et $50\% \text{ fT} > C_T$ de 2.5 mg/L pour l'AVI ont été considérées lors des analyses de PTA (204). Ces cibles PK/PD ont été confirmées dans un modèle d'infection de la cuisse de souris neutropéniques démontrant une bonne corrélation *in vitro-in vivo* de cette approche.

Les analyses de PTA, basées sur l'atteinte simultanée des cibles PK/PD de la β -lactamine et de l'inhibiteur de β -lactamases chez plus de 90% des patients, sont recommandées par les agences du médicament pour justifier la sélection du schéma posologique de ces associations en clinique (170). Elles ont, par exemple, été utilisées dans le cas de l'association ceftazidime-AVI pour sélectionner la dose à administrer en phase III (223). Cependant, en considérant deux cibles PK/PD indépendantes pour ATM et AVI lors du calcul de PTA, cette approche pose un problème conceptuel et pourrait pénaliser les associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases dans certaines situations, notamment quand la CMI est faible. En effet, en fonction de la valeur de $\text{CMI}_{\text{ATM-AVI}}$, l'ATM et l'AVI vont alternativement être les facteurs limitants lors de l'évaluation de l'efficacité de l'association. En simulant les concentrations libres d'ATM pour un individu typique après l'administration de 2g d'ATM toutes les 8h à partir d'un modèle PK de population précédemment développé (224), il a été possible de prédire le $\% \text{ fT} > \text{CMI}_{\text{ATM-AVI}}$ pour l'ATM en fonction de différentes valeurs de $\text{CMI}_{\text{ATM-AVI}}$ (**Figure 24**). Selon les résultats de ces simulations, le $\% \text{ fT} > \text{CMI}_{\text{ATM-AVI}}$ pour l'ATM deviendrait supérieur à 60% dès que la $\text{CMI}_{\text{ATM-AVI}}$ serait inférieure à 8-16 mg/L. Et dans ce cas, c'est l'AVI qui deviendrait le facteur limitant. Et pour les souches avec une valeur de $\text{CMI}_{\text{ATM-AVI}} < 4$ mg/L, il existe un risque qu'un échec du traitement soit prédit alors que les concentrations d'ATM devraient être largement supérieures à la $\text{CMI}_{\text{ATM-AVI}}$. Cela suggère également que dans certains cas la dose d'ATM recommandée pourrait être supérieure à celle nécessaire. Ces résultats doivent toutefois être interprétés avec prudence car les simulations sont basées sur le profil PK d'un individu sain typique. Chez un patient avec une fonction rénale altérée, à moins d'un ajustement de posologie, le $\% \text{ fT} > \text{CMI}_{\text{ATM-AVI}}$ pour l'ATM devrait rester supérieur à 60% pour des valeurs de CMI encore plus élevées.

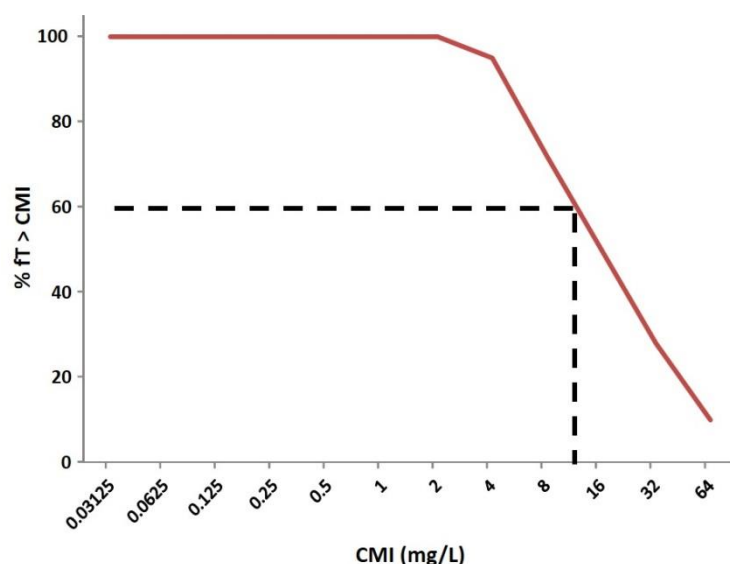


Figure 24. Pourcentage de temps pendant lequel les concentrations libres d'ATM sont supérieures à la CMI (% ft > CMI) en fonction de différentes valeurs de CMI, chez des volontaires sains recevant 2 g d'ATM toutes les 8 h.

De plus, une autre limite de cette approche est que la $CMI_{ATM-AVI}$ considérée pour la détermination de la cible PK/PD de l'ATM est la CMI déterminée en présence de 4 mg/L d'AVI. Cette concentration est la concentration usuellement utilisée dans les tests *in vitro* de sensibilité aux associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases (225, 226) car elle est considérée comme la concentration maximale inhibant les β -lactamases sans que l'inhibiteur n'ait d'effet bactéricide propre, et permet ainsi de différencier les bactéries sensibles des bactéries résistantes à l'association (82, 204). Or, dans les études évaluant la PK/PD de l'AVI, les concentrations d'AVI variaient au cours du temps causant alors des fluctuations de la $CMI_{ATM-AVI}$.

Une autre approche a été utilisée par Bhagunde et al. (227) qui, elle, tient compte de l'interaction entre l'inhibiteur de β -lactamases et la β -lactamine et qui a été proposée pour la sélection de schémas posologiques optimaux pour ce type d'association. Un modèle Emax sigmoïde a été utilisé pour caractériser la diminution de la CMI de l'imipénème en fonction de la concentration de rélébactam. Les paramètres du modèle ont ensuite été utilisés pour simuler les profils de CMIs instantanées (CMI_i) de l'imipénème au cours du temps dépendant de la concentration de rélébactam après administration de différents schémas posologiques (**Figure 25**). Conceptuellement, la CMI_i pourrait être considérée comme une mesure de la sensibilité à l'imipénème quand les concentrations de rélébactam varient au cours du temps.

Enfin, les profils de CMI_i et des concentrations plasmatiques d'imipénème correspondant à une dose clinique ont été superposés afin de déterminer le temps au-dessus de la CMI_i ($T > CMI_i$). Le modèle a ainsi permis de prédire les valeurs de $fT > CMI_i$ correspondant à différents schémas posologiques de rélébactam.

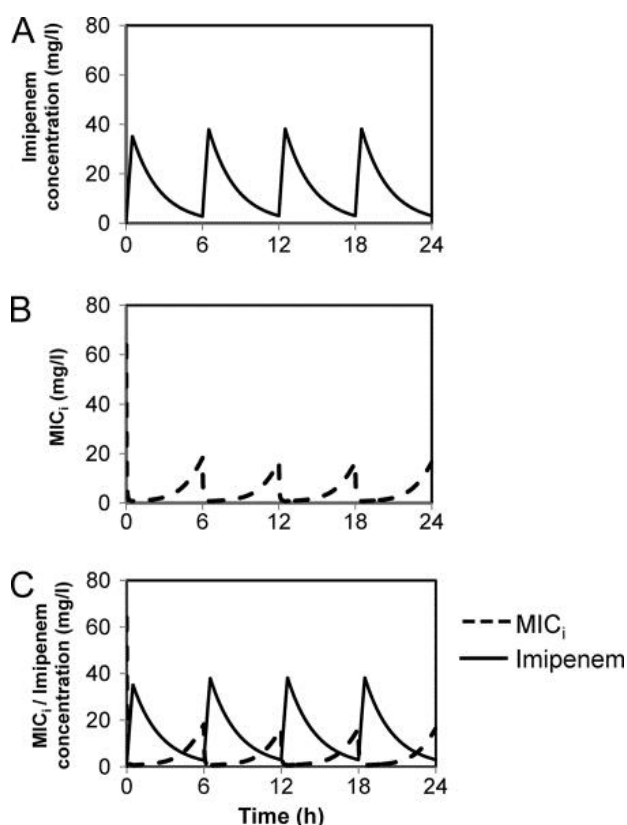


Figure 25. Différents profils de concentrations en fonction du temps. (A) Concentrations d'imipénème résultant de l'administration d'une dose clinique de 500 mg toutes les 6 h. (B) Profil de CMI instantanée (MIC_i) résultant des concentrations fluctuantes du rélébactam. (C) Concentrations d'imipénème superposées aux valeurs de MIC_i (d'après Bhagunde P, 2012 (227)).

L'effet antimicrobien correspondant à différentes valeurs simulées de $T > CMI_i$ a ensuite été évalué dans un modèle HF afin d'identifier la cible PK/PD à atteindre. Cette approche qui permet de guider la sélection de schémas posologiques en considérant l'impact d'un inhibiteur de β -lactamases sur la CMI d'une β -lactamine à chaque instant est intéressante mais basée que sur des données *in vitro*. Or, les effets observés dans les modèles *in vitro* ne sont pas toujours prédictifs des effets attendus en clinique compte tenu du fait que ce type de modèle ne tient généralement pas compte des processus pathophysiologiques tels que le développement de biofilms, pouvant avoir un impact sur la PK de l'antibiotique en altérant sa capacité à atteindre sa cible. Ils ne tiennent pas compte non plus de l'impact du système

immunitaire sur la PD de l'antibiotique, et qui contribue à l'élimination des bactéries. Des modèles décrivant l'influence du système immunitaire ont été développés et, couplés à des modèles PK/PD semi-mécanistiques, pourraient améliorer les extrapolations *in vitro-in vivo* (228-231). Une autre limite des modèles *in vitro* est que le volume des compartiments contenant l'antibiotique et les bactéries, et représentant l'organisme, est beaucoup plus grand que dans la plupart des modèles animaux d'infection. Ainsi, la capacité à détecter un petit nombre de bactéries résistantes est beaucoup plus grande avec des modèles *in vitro* qu'avec des modèles animaux. De plus, les bouillons de culture utilisés pour ces études fournissent un environnement riche pour la croissance bactérienne conduisant à une vitesse de croissance *in vitro* généralement supérieure à celle observée *in vivo* (232). Certaines études ont été conduites en ajoutant de l'albumine humaine ou du sérum humain au bouillon de culture afin d'évaluer l'impact de la fixation des antibiotiques aux protéines plasmatiques sur la réponse bactérienne. Pour les molécules à forte fixation protéique, il a été montré que l'ajout d'albumine humaine ou de sérum réduisait l'activité de ces antibiotiques dans les modèles *in vitro* (179, 233, 234). Ainsi, l'extrapolation à la clinique de résultats d'expériences *in vitro* menées en absence d'albumine ou de sérum, devrait se faire en utilisant les concentrations libres d'antibiotiques observées chez les volontaires sains ou les patients. Toutefois, il reste à déterminer si ces concentrations libres peuvent être atteintes au niveau du site d'infection.

Pour compléter les connaissances PK/PD disponibles sur l'ATM-AVI, l'approche développée par Bhagunde et al. (227) a été reprise dans le cadre de cette thèse pour évaluer de façon simple et rapide l'impact de l'AVI sur la CMI de l'ATM. Le modèle Emax sigmoïde n'a cependant pas été utilisé pour dériver un schéma posologique mais pour comparer la capacité de l'AVI à restaurer la sensibilité à l'ATM de plusieurs souches productrices de différentes β -lactamases lors d'une étape de *screening*. Cela a ainsi permis de fournir des informations intéressantes sur les profils d'inhibition de différents types d'enzymes. Il a par exemple été constaté que l'AVI pouvait réduire la CMI de l'ATM par un facteur 100 avec une puissance (IC_{50}) de 0.053 mg/L chez *E. cloacae* 1251704 et par un facteur 10000 avec une puissance de 0.00064 mg/L chez *C. freundii* 974673 (Article III, Tableau 1, p. 109). Cependant, il est difficile de généraliser quant à l'efficacité de l'AVI en fonction du type de β -lactamases puisque toutes les souches étudiées dans les études de *checkerboard*, sauf une, produisaient plus d'un type d'enzymes. De plus pour deux souches d'*E. cloacae* différentes (*E. cloacae* 1285905 et *E. cloacae* 1318536) exprimant exactement les mêmes β -lactamases, différents ratios d'efficacité (CMI_0/CMI_{∞}) ont été estimés, suggérant que ce paramètre n'est

pas seulement le reflet de l'affinité de l'AVI pour les β -lactamases. Il témoigne également de la capacité de l'AVI à diminuer la CMI de l'ATM à un niveau comparable pour deux souches (CMI₀ = 0.21 mg/L pour *E.cloacae* 1285905 et 0.083 mg/L pour *E. cloacae* 1318536) dont le niveau d'expression des β -lactamases, représenté par les valeurs de CMI₀, diffère (CMI₀ = 64 mg/L pour *E.cloacae* 1285905 et 510 mg/L pour *E. cloacae* 1318536).

L'IC₅₀ est un paramètre caractérisant bien les modèles Emax ou Emax sigmoïde. Cependant, pour se rapprocher des concentrations cibles en thérapeutique, il serait sans doute plus intéressant de prendre en compte la valeur d'IC₉₀ de l'AVI correspondant à la concentration d'AVI qui produit 90% de l'effet maximum, pour les différentes souches étudiées (**Tableau 3**). Les valeurs d'IC₉₀ prédites par le modèle (0.0020-0.55) sont très souvent largement inférieures et au minimum cinq fois inférieures à la concentration de 2.5 mg/L d'AVI définie comme la concentration seuil inhibitrice en dessous de laquelle l'inhibition des β -lactamases est insuffisante pour prévenir la croissance bactérienne et utilisée *in vivo* pour l'évaluation de la PK/PD de l'AVI. Ces deux approches complètement différentes conduisent finalement à la détermination de concentrations efficaces d'AVI relativement comparables dans le cas des souches pour lesquelles l'effet de l'AVI sur la CMI de l'ATM est moins puissant. Ce cas de figure correspond à la situation la moins fréquente mais la plus défavorable, qu'il convient donc de considérer dans le but de cibler la concentration d'AVI permettant de prévenir la dégradation de l'ATM et restaurer son efficacité chez un maximum de souches quel que soit leur niveau de résistance, même si dans la plupart des cas des concentrations d'AVI largement inférieures à celles recommandées devraient être suffisantes. Néanmoins cette hypothèse est fondée sur des données *in vitro* et nécessiterait d'être validée *in vivo* en raison des limites des modèles *in vitro* décrites précédemment.

Tableau 3. Concentrations d'AVI produisant 50% (IC₅₀) et 90% (IC₉₀) de son effet maximum sur la CMI de l'ATM chez 11 souches d'*Enterobacteriaceae* multi-résistantes.

Souche		AVI IC ₅₀ (mg/L)	AVI IC ₉₀ (mg/L)
<i>E. coli</i>	1275629	0.00040	0.0036
<i>K. pneumoniae</i>	1277372	0.00047	0.0043
<i>K. pneumoniae</i>	1289268	0.00064	0.0058
<i>K. pneumoniae</i>	1251604	0.00053	0.0048
<i>K. pneumoniae</i>	947566	0.0018	0.016
<i>C. freundii</i>	974673	0.00053	0.0048
<i>C. freundii</i>	1080008	0.015	0.14
<i>E. aerogenes</i>	1286221	0.00026	0.0023
<i>E. cloacae</i>	1285905	0.0037	0.034
<i>E. cloacae</i>	1318536	0.00022	0.0020
<i>E. cloacae</i>	1251704	0.053	0.55

Un autre problème rencontré avec l'étude de Bhagunde et al. (227) ainsi que lors de cette thèse, est que la PD repose sur des valeurs de CMI. Or celles-ci correspondent à des valeurs discrètes (par exemple, 128 ou 64 mg/L sans possibilité d'obtenir une valeur intermédiaire). Et il est fréquent que, d'un réplica à un autre, la CMI soit déterminée avec une dilution d'écart pour une même souche. Dans ce cas, au lieu de considérer la moyenne de ces deux valeurs, une troisième détermination est réalisée afin de confirmer l'une des deux premières valeurs obtenues. De plus, les CMI sont déterminées à un instant donné (après 16-20 h d'incubation). Par conséquent, l'effet d'un inhibiteur de β -lactamases sur la CMI de l'antibiotique associé correspond à un effet moyen qui n'a de sens que si la PD est stable. Or, des phénomènes d'adaptation se traduisant par des décroissances rapides suivies de repousse sont fréquemment observés lors des expériences de cinétique de bactéricidie, et dans cette situation la valeur de CMI en général et celles de CMI instantanées estimées par Bhagunde et al. (227) doivent être interprétées avec beaucoup de prudence. Il a été fait le choix d'analyser les données de *checkerboard* de notre étude de façon individuelle, et sans avoir répliqué les mesures. Or, en ne considérant qu'une seule valeur de CMI par concentration d'AVI et par souche, ce type d'analyse individuelle ne permet pas de caractériser correctement la variabilité liée à l'imprécision de mesure de la CMI conduisant au risque d'estimer des paramètres tels que CMI₀ de façon aussi biaisée que la mesure expérimentale. Cette méthode pourrait donc être optimisée bien que, compte tenu de l'amplitude des valeurs de CMI déterminées pour chaque souche, il est peu probable que l'estimation du ratio d'efficacité ou de l'IC₅₀ soit très différente selon la méthode d'analyse des données utilisée. Enfin, l'objectif

étant avant tout de proposer une approche simple et rapide pour comparer l'activité d'un inhibiteur entre différentes souches, comme réalisé pour l'AVI dans notre étude, ou pour comparer l'efficacité et la puissance de différents inhibiteurs pour une souche donnée lors d'étapes de *screening*, une approche plus complexe n'aurait pas eu forcément d'intérêt dans ce cas.

L'étape suivante a consisté à analyser les données d'études de cinétique de bactéricidie avec une approche de modélisation PK/PD semi-mécanistique dans le but de caractériser l'effet combiné de l'ATM-AVI au cours du temps et non plus seulement à un instant donné, et de mieux comprendre les mécanismes d'action des molécules associées. De nombreux modèles différents ont été utilisés pour décrire la PD des antibiotiques (166, 180, 235-239) mais très peu dans le cas de l'association d'une β -lactamine à un inhibiteur de β -lactamases (214, 215).

Un modèle PK/PD a donc été développé au cours de ce projet de thèse à partir de données d'études statiques afin d'explorer de façon plus approfondie la PK/PD de l'ATM-AVI. Quatre souches d'*Enterobacteriaceae*, précédemment étudiées dans les expériences de *checkerboard*, ont été sélectionnées en raison de leur profil de β -lactamases, de leur espèce et des profils de CMI en fonction des concentrations d'AVI observés lors de ces premières expériences *in vitro*. Du fait du nombre infini de combinaisons de concentrations qui peuvent être testées lors des études de cinétique de bactéricidie, des choix ont dû être faits. Pour cela, le schéma expérimental proposé par Sy et al. pour l'étude des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases (213) a été imité. Ainsi, les études préliminaires de *checkerboard* ont permis de bien sélectionner les concentrations d'ATM et d'AVI à tester en monothérapie et en combinaisons afin de caractériser à la fois la croissance des bactéries, l'effet des deux molécules sur l'élimination des bactéries et le développement de résistance. Etant donné les très faibles valeurs d'IC₅₀ reportées pour l'AVI lors des expériences de *checkerboard* (la plupart des valeurs d'IC₅₀ étaient largement inférieures à 0.1 mg/L), il était important d'étudier l'effet de faibles concentrations de cette molécule en combinaison avec l'ATM et donc d'utiliser une plus large gamme de concentrations (0.004-64 mg/L) que lors des études précédentes (1-64 mg/L) (240). Ces études menées sur 24 h ont ainsi permis de comparer en fonction de la concentration d'ATM, de la concentration d'AVI et du ratio entre les concentrations d'ATM et d'AVI utilisés, l'effet bactéricide de l'ATM, sa dégradation par les β -lactamases, ainsi que les trois effets de l'AVI reportés précédemment : l'inhibition de la

dégradation de l'ATM par les β -lactamases, son effet bactéricide propre et son effet potentialisateur de l'activité de l'ATM (214).

Le modèle PK/PD développé par Sy et al. pour l'association ATM-AVI (214) a été utilisé comme point de départ pour construire le modèle et ainsi l'étendre pour quatre souches supplémentaires. Seulement quelques modifications ont été apportées par rapport au modèle de référence pour s'adapter notamment à nos données et aux conditions expérimentales avec l'utilisation de concentrations d'AVI plus faibles. Les différents profils de CFU en fonction du temps ont été bien caractérisés par le modèle pour toutes les souches étudiées. Cependant, les souches ont été considérées séparément. Un modèle de structure commun a été utilisé mais un set de paramètres a été estimé pour chaque souche. Ainsi, pour comparer la réponse à l'ATM-AVI entre les différentes souches, il suffisait de comparer la valeur des paramètres estimés. Il pourrait être envisagé, dans des études futures, d'analyser les données avec un modèle de population en considérant chaque souche comme un individu différent de la population. Toutefois, l'estimation de la variabilité inter-souche dans un tel modèle devra être interprétée avec prudence car les souches ont été sélectionnées spécifiquement et non pas de façon aléatoire dans une plus large population.

Le principal aspect innovant de cette étude a été d'évaluer, à l'aide de simulations, l'impact de chaque effet de l'AVI sur l'élimination des bactéries à des concentrations d'ATM et d'AVI proches de celles correspondant aux doses actuellement utilisées en clinique (2 g pour l'ATM et 0.5 g pour l'AVI quand il est administré en association avec la ceftazidime) (224, 241). Ainsi, en plus de décrire la cinétique des effets antimicrobiens, cette étude a montré que l'approche de modélisation PK/PD semi-mécanistique pouvait permettre d'évaluer la contribution relative de chaque mécanisme d'action des molécules associées à l'effet combiné total, ce qui ne pouvait pas être fait à partir des indices PK/PD ou du modèle Emax dont les paramètres permettent de décrire l'effet de l'AVI sur la CMI de l'ATM dans sa globalité sans distinguer ses différents modes d'action. A titre d'exemple, dans l'Article III, la réduction de la CMI de l'ATM en présence de concentrations croissantes d'AVI chez *C. freundii* 1080008 produisant uniquement des MBLs (VIM-23) (Tableau III.1, p. 109) a montré que l'interaction PD entre l'ATM et l'AVI n'était pas seulement due à l'inhibition des β -lactamases, l'AVI étant inactif contre les MBLs, mais aussi à d'autres mécanismes qui ne peuvent cependant pas être différenciés avec cette approche aussi simple. Selon les simulations du modèle, quel que soit les niveaux de concentrations d'ATM et d'AVI testés

(faible, intermédiaire ou élevé), l'activité bactéricide de l'association était principalement expliquée par l'effet potentialisateur de l'AVI pour trois des quatre souches étudiées et ce malgré la capacité de l'AVI à prévenir la dégradation de l'ATM de manière efficace même à de très faibles concentrations. Pour la quatrième souche, l'effet bactéricide de l'AVI en plus de celui de l'ATM s'est avéré contribuer davantage à l'efficacité de l'association mais seulement à des niveaux élevés de concentrations. Par conséquent, la diminution de la CMI de l'ATM observée dans les expériences de *checkerboard* avec *C. freundii* 1080008 est très probablement le résultat de l'effet potentialisateur de l'AVI. De plus, les résultats des simulations suggèrent qu'à une concentration de 2.5 mg/L d'AVI, l'effet potentialisateur de l'activité de l'ATM joue un rôle important dans l'efficacité de l'association (Article IV, Figures 10-11, p. 130-131), poussant à s'interroger sur la signification de cette concentration seuil utilisée lors de l'évaluation de la PK/PD de l'AVI. Cependant, le modèle et les simulations, présentés dans l'Article IV, sont basés sur des études de cinétique de bactéricidie réalisées avec des concentrations constantes d'AVI et des concentrations d'ATM ne variant qu'à cause de la dégradation par les β -lactamases. Par conséquent, il serait intéressant de compléter ces expériences avec des études dynamiques de type HF et/ou des études *in vivo* où les bactéries seraient exposées à des concentrations d'ATM-AVI variant suivant leur demi-vie d'élimination. Un modèle HF est en cours de développement au laboratoire et devrait très prochainement pouvoir être utilisé afin de valider le modèle PK/PD et évaluer si la contribution relative de chaque effet de l'AVI dans des conditions statiques est toujours la même après la simulation de profils PK humains.

Enfin, dans l'Article IV, il a été montré que, bien que les études de cinétique de bactéricidie nécessitaient d'un travail intensif avec un nombre important de combinaisons à tester et que, l'analyse des données nécessitait des compétences en modélisation supérieures à l'analyse des données de *checkerboard*, l'approche de modélisation PK/PD semi-mécanistique pouvait fournir des informations intéressantes quant au mécanisme d'action et à l'interaction PD complexe qui peut exister entre deux molécules associées. En mettant en avant le fait que l'effet potentialisateur jouait un rôle important dans l'efficacité de l'association ATM-AVI, ces résultats devraient encourager le développement de nouveaux inhibiteurs possédant cette capacité d'interaction avec les β -lactamines en plus de leur capacité à inhiber les β -lactamases.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis d'aborder et de répondre à différentes questions qui se posent lors de la caractérisation de l'effet d'un inhibiteur de β -lactamases, l'AVI en l'occurrence, sur l'activité d'une β -lactamine, l'ATM dans notre cas.

La problématique a tout d'abord été abordée d'un point de vue PK en étudiant la distribution de l'ATM-AVI dans le liquide interstitiel du muscle et le liquide intrapéritonéal de rats avec ou sans péritonite par la technique de microdialyse. L'ATM tout comme l'AVI se distribue rapidement dans ces deux milieux, permettant d'atteindre des concentrations élevées au niveau du site infectieux. De plus l'AVI ne semble pas modifier la PK de l'ATM. Ces résultats mériteraient néanmoins d'être confirmés chez le patient lors d'une étude clinique.

Dans une deuxième partie, consacrée à l'étude de la PD de l'ATM-AVI, la capacité de l'AVI à restaurer la sensibilité de souches d'*Enterobacteriaceae* productrices de diverses β -lactamases à l'ATM a été évaluée de manière quantitative. La méthode des *checkerboard* suivie de la détermination de l'indice FIC est une façon simple d'évaluer l'interaction entre deux antibiotiques mais, n'étant pas appropriée dans le cas des associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases, une approche alternative a été proposée. Les expériences de *checkerboard* analysées avec un modèle Emax ont ainsi permis de quantifier l'effet de l'AVI sur la CMI de l'ATM, à la fois en termes d'efficacité et de puissance. Ce modèle n'est pas un modèle mécanistique mais a l'avantage d'être simple et rapide pour caractériser l'effet global d'un inhibiteur de β -lactamases. Cette approche a ainsi permis, lors d'une étape de *screening*, de comparer l'activité de l'AVI entre différentes souches produisant diverses β -lactamases, mais elle pourrait aussi très bien être utilisée pour comparer l'efficacité et la puissance de différents inhibiteurs pour une souche particulièrement problématique en clinique afin de sélectionner l'association la plus efficace. Et ce modèle a déjà été utilisé par d'autres auteurs afin de guider la sélection de schémas posologiques optimaux pour une association β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases. L'utilisation de ce modèle, basé uniquement sur des données *in vitro*, dans le but de dériver des schémas posologiques est néanmoins sujet à discussion. Nous espérons que cette approche soit largement utilisée à l'avenir afin de pouvoir préciser rétrospectivement son véritable intérêt ainsi que ses limites.

Les approches PK/PD traditionnelles dérivées des indices PK/PD usuels pour la détermination d'une cible PK/PD pour la β -lactamine et d'une autre pour l'inhibiteur de β -lactamases, ont permis la sélection de schémas posologiques pour ce type d'associations mais posent un problème conceptuel en considérant que ces deux molécules agissent de manière indépendante l'une de l'autre alors qu'à priori l'AVI est censé avoir peu ou pas d'effet antibiotique et qu'il est censé agir principalement par inhibition des β -lactamases. Les approches de modélisation PK/PD semi-mécanistiques prenant en compte les variations des concentrations et de l'effet combiné des molécules associées au cours du temps semblent plus satisfaisantes pour caractériser l'interaction entre les molécules et donc évaluer l'efficacité de l'association après administration de différents schémas posologiques. Dans le cadre de cette thèse, le modèle PK/PD semi-mécanistique développé à partir des données *in vitro* de cinétique de bactéricidie a permis d'explorer la contribution relative de chacun des mécanismes d'action de l'AVI à l'effet combiné total. Des résultats plutôt inattendus ont été obtenus suggérant que l'importance relative de l'activité inhibitrice de l'AVI serait bien plus modeste qu'escomptée. Ces résultats ne constituent qu'une étape dans l'évaluation de la PK/PD de l'ATM-AVI, d'autres expériences *in vitro* de type HF devront être menées pour confirmer ces premières données et valider le modèle PK/PD. Ensuite, la capacité du modèle à prédire l'efficacité de l'ATM-AVI *in vivo* devra être évaluée.

En conclusion ce travail de thèse et en particulier la recherche d'un modèle PK/PD semi-mécanistique pour caractériser l'activité de l'association ATM-AVI, a abouti à des résultats en partie inattendus, ouvrant d'intéressantes perspectives d'études pour l'avenir.

ANNEXES

Annexe 1 : Fonctions d'interaction pour les associations d'agents antimicrobiens

1. Modèles additifs

Il est courant d'explorer, en fonction de l'ajustement du modèle, quelle fonction d'interaction décrit le mieux les données, compte tenu de ce que l'on sait de l'interaction. Une **fonction d'interaction de base** consiste à simplement additionner les effets de chaque agent :

$$E_{AB} = E_A + E_B$$

(Équation 4)

Où E_A correspond à l'effet de la molécule A, E_B l'effet de la molécule B et E_{AB} l'effet observé pour l'association des molécules A et B. L'indice d'interaction (I) correspondant est calculé selon l'équation suivante :

$$I = \frac{E_A + E_B}{E_{AB}}$$

(Équation 5)

Par conséquent, si l'effet observé (E_{AB}) est supérieur à l'effet additif attendu donné par la somme des effets individuels ($E_A + E_B$), l'association sera considérée comme synergique ($I < 1$). Dans le cas contraire ($I > 1$), l'association sera antagoniste. Cependant, cette approche est discutée car elle suppose une relation linéaire entre la concentration et l'effet alors que les effets des médicaments sont généralement décrits en utilisant des modèles E_{max} ou E_{max} sigmoïde (**Équation 2**). Ainsi, si les effets des molécules A et B en monothérapie sont décrits par des modèles E_{max} identiques, $E_{max_{A+B}}$ n'est pas égal à $E_{max_A} + E_{max_B}$ mais est égal à $E_{max_A} = E_{max_B}$. Cette approche pourrait donc conduire à une mauvaise interprétation de

l'effet de l'association médicamenteuse : dans ce cas, une association synergique pourrait être moins efficace que ses composants pris individuellement (187). Pour cette raison, d'autres modèles d'additivité ont été proposés. Deux modèles de référence ont été largement utilisés pour quantifier l'activité conjointe de deux molécules: le modèle d'indépendance de Bliss (242) et le modèle additif de Loewe (243).

Le **modèle d'indépendance de Bliss** est basé sur la théorie des probabilités et fait l'hypothèse que les molécules agissent indépendamment, c'est-à-dire qu'elles ont des mécanismes d'action différents de telle manière qu'elles n'interfèrent pas entre elles, mais elles contribuent à un résultat commun tel que la mort bactérienne (**Équation 6**).

$$E_{AB} = E_A + E_B - E_A \cdot E_B$$

(**Équation 6**)

Où les effets E_A , E_B et E_{AB} sont exprimés comme des probabilités et sont donc compris entre 0 et 1. L'indice d'interaction I résultant peut être alors calculé comme suit :

$$I = \frac{E_A + E_B - E_{AB}}{E_{AB}}$$

(**Équation 7**)

Un modèle d'indépendance de Bliss a été utilisé pour décrire l'interaction entre la vancomycine et le méropénème contre des souches de *S. aureus* sensibles à la méthicilline (197). L'effet inhibiteur combiné de ces deux antibiotiques sur le taux de croissance des bactéries a été défini selon l'équation suivante :

$$Effet = (1 - E_{MER}) \times (1 - E_{VAN}) = 1 - (E_{MER} + E_{VAN} - E_{MER} \cdot E_{VAN})$$

(**Équation 8**)

Où E_{MER} et E_{VAN} , correspondant aux effets du méropénème et de la vancomycine respectivement, sont décrits par des modèles Emax sigmoïde (**Équation 2**). Les effets devant être compris entre 0 et 1 dans le modèle d'indépendance de Bliss, l'effet maximum du

méropénème ($E_{\max, \text{MER}}$) a été fixé à 1 pour prendre en compte le fait que l'effet du méropénème était plus important que celui de la vancomycine dans cette étude. Et le paramètre $E_{\max, \text{VAN}}$ correspondant au pourcentage par lequel la vancomycine diminue le taux de croissance au maximum a, quant à lui, été estimé.

Le modèle d'indépendance de Bliss est considéré comme l'un des modèles les plus populaires pour évaluer les effets combinés des molécules mais il présente certaines limites (187). Tout d'abord, la recherche d'une association synergique implique souvent des molécules avec des mécanismes d'action multiples, complexes et parfois inconnus. Il est ainsi difficile de vérifier l'hypothèse d'indépendance des mécanismes d'actions associée au modèle de Bliss. De plus, le modèle de Bliss s'applique uniquement aux effets exprimés sous forme probabilités comprises entre 0 et 1.

Par opposition au modèle d'indépendance de Bliss qui est une approche basée sur l'effet, le **modèle additif de Loewe** est une approche basée sur la relation concentration-effet. Elle repose sur le principe que l'effet d'une concentration a de la molécule A est équivalent à l'effet d'une concentration b_a de la molécule B et inversement, une concentration b de la molécule B est équivalent à l'effet d'une concentration a_b de la molécule A. Elle est basée également sur le principe qu'une molécule ne peut pas interagir avec elle-même c'est-à-dire, par exemple, qu'une concentration b_a ajoutée à n'importe quelle autre concentration b de la molécule B produit forcément un effet additif. Selon cette approche, l'effet additif des molécules A et B dépend donc des courbes concentration-effet individuelles de chaque molécule et peut être exprimé comme suit :

$$E_{AB} = \text{Effet}(a + b) = E_A(a + a_b) = E_B(b_a + b)$$

(Équation 9)

Où $(a + a_b)$ correspond à la concentration de la molécule A et $(b_a + b)$ à la concentration de la molécule B produisant le même effet (E_{AB}) que celui résultant de l'association des deux molécules aux concentrations de a et b . Il est donc fait l'hypothèse que les deux molécules associées ont des effets maximums individuels ($E_{\max}$) identiques et que seules leurs valeurs d' EC_{50} diffèrent. En pratique, cela se traduit par des courbes concentration-effet parallèles et un ratio de concentrations constant à chaque niveau d'effet ($R = \frac{A}{B}$). Une relation simple entre

les paires de concentrations (a, b) produisant l'effet E_{AB} et les concentrations A et B des molécules en monothérapie nécessaires pour atteindre ce même effet peut alors être établie :

$$a + a_b = A \leftrightarrow a + b \times R = A \leftrightarrow a + b \times \frac{A}{B} = A$$

(Équation 10)

Ce qui conduit à l'équation d'additivité de Loewe qui est à la base de nombreuses approches d'évaluation des interactions :

$$I = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

(Équation 11)

Quand cette relation (Équation 11), correspondant à l'indice d'interaction I pour le modèle additif de Loewe, est inférieure à 1, cela signifie que les concentrations a et b produisant un certain effet en association sont inférieures à celles attendues et qu'elles peuvent donc être considérées comme synergiques. Au contraire, lorsque $I > 1$, les concentrations a et b sont considérées comme antagonistes. Quand l'effet de chaque molécule en monothérapie est caractérisé par un modèle E_{max} sigmoïde, alors l'(Équation 12), qui correspond à un réarrangement de l'(Équation 2), relie la concentration de la molécule A produisant l'effet E_{AB} au niveau de réponse observé et aux paramètres EC_{50} , E_{max} et γ :

$$A = EC_{50,A} \left(\frac{E_{AB}}{E_{max} - E_{AB}} \right)^{1/\gamma_A}$$

(Équation 12)

Il en est de même pour la molécule B, et l'indice d'interaction décrivant l'additivité de Loewe des effets combinés de deux agents est défini selon l'équation suivante :

$$I = \frac{a}{EC_{50,A} \left(\frac{E_{AB}}{E_{max} - E_{AB}} \right)^{1/\gamma_A}} + \frac{b}{EC_{50,B} \left(\frac{E_{AB}}{E_{max} - E_{AB}} \right)^{1/\gamma_B}}$$

(Équation 13)

2. Modèles dérivés de l'indépendance de Bliss et de l'additivité de Loewe

Un **modèle d'interaction de Bliss** dérivé du modèle d'indépendance de Bliss a été défini selon l'équation suivante (244) :

$$E_{AB} = E_A + E_B - \beta \cdot E_A \cdot E_B$$

(Équation 14)

Où β est le paramètre quantifiant l'interaction. Si $\beta = 1$, on retrouve l'indépendance de Bliss ce qui signifie que les deux molécules n'interagissent pas entre elles. Un paramètre $\beta > 1$ ou < 1 indique une interaction antagoniste ou synergique, respectivement. Mais il a été conclu que ce modèle ne donnait pas des résultats suffisamment robustes (244).

Le **modèle de Greco** est une extension de l'additivité de Loewe incluant un paramètre d'interaction α décrivant les écarts par rapport à l'additivité (190) :

$$I = \frac{a}{EC_{50,A} \left(\frac{E_{AB}}{E_{max} - E_{AB}} \right)^{1/\gamma_A}} + \frac{b}{EC_{50,B} \left(\frac{E_{AB}}{E_{max} - E_{AB}} \right)^{1/\gamma_B}} + \frac{\alpha \cdot a \cdot b}{EC_{50,A} \cdot EC_{50,B} \cdot \left(\frac{E_{AB}}{E_{max} - E_{AB}} \right)^{(1/2\gamma_A + 1/2\gamma_B)}}$$

(Équation 15)

Ainsi, l'effet additif des deux molécules associées est décrit par la somme des deux premiers termes et le troisième terme est le terme d'interaction où α indique la nature de l'interaction. L'interaction est additive si l'intervalle de confiance à 95% de l'estimation de α comprend la valeur 0. Si $\alpha > 0$ ou $\alpha < 0$, l'interaction est soit synergique, soit antagoniste, respectivement. Ce modèle a été utilisé pour décrire l'interaction entre un nouvel aminoglycoside, la

vertilmicine, et la ceftazidime contre une souche de *P. aeruginosa* (202). Il a été fait l'hypothèse que les paramètres de sigmoïdité, γ_A et γ_B , étaient égaux de telle manière que le modèle Emax final utilisé pour l'étude de cette association était :

$$E_{AB} = \frac{E_{max} \left(\frac{a}{EC_{50,A}} + \frac{b}{EC_{50,B}} + \frac{\alpha \cdot a \cdot b}{EC_{50,A} \cdot EC_{50,B}} \right)^\gamma}{1 + \left(\frac{a}{EC_{50,A}} + \frac{b}{EC_{50,B}} + \frac{\alpha \cdot a \cdot b}{EC_{50,A} \cdot EC_{50,B}} \right)^\gamma}$$

(Équation 16)

Le paramètre d'interaction α a été estimé à une valeur de 3.67 avec un intervalle de confiance à 95% de [-0.80, 8.14] indiquant un effet additif de l'association vertilmicine-ceftazidime sur la mort bactérienne, puisqu'il englobe la valeur 0.

Les modèles précédemment décrits se limitent à l'interaction entre deux molécules et évaluent uniquement des interactions symétriques (l'effet de A sur B est identique à l'effet de B sur A) avec l'estimation d'un seul paramètre d'interaction. Une nouvelle approche, le **modèle général d'interaction pharmacodynamique (GPDI)**, a été récemment développée par Wicha *et al.* (245) pour surmonter notamment ces limites. Le modèle GPDI, basé sur le modèle d'indépendance de Bliss, peut être appliqué pour des associations de plus de deux molécules et ne nécessite pas de connaître leur mécanisme d'action précis. De plus, ce modèle permet différents effets maximums pour chaque molécule, surpassant ainsi une importante limite du modèle de Greco. Le modèle GPDI est développé à partir d'approches mécanistiques, basées sur les modèles d'interaction compétitive entre ligand et récepteur, et à partir des modèles empiriques basés sur le critère d'additivité. Dans ce modèle, l'interaction PD est caractérisée par une fonction de la concentration d'une molécule dite « coupable » qui modifie un paramètre PD d'une deuxième molécule dite « victime ». Chaque molécule peut être à la fois « victime » et « coupable » en même temps permettant ainsi de quantifier des interactions bidirectionnelles. Pour deux molécules associées, dont les effets en monothérapie sont décrits par un modèle Emax sigmoïde, le modèle GPDI est donné par les équations suivantes :

$$E_A = \frac{E_{max,A} \cdot a^{\gamma_A}}{\left(EC_{50,A} \left(1 + \frac{INT_{AB} \cdot b^{\gamma_{INT,B}}}{EC_{50,INT AB}^{\gamma_{INT,B}} + b^{\gamma_{INT,B}}} \right) \right)^{\gamma_A} + a^{\gamma_A}}$$

(Équation 17)

$$E_B = \frac{E_{max,B} \cdot b^{\gamma_B}}{\left(EC_{50,B} \left(1 + \frac{INT_{BA} \cdot a^{\gamma_{INT,A}}}{EC_{50,INT BA}^{\gamma_{INT,A}} + a^{\gamma_{INT,A}}} \right) \right)^{\gamma_B} + b^{\gamma_B}}$$

(Équation 18)

Où INT_{AB} caractérise le changement fractionnaire maximal de l' EC_{50} de la molécule A (« victime ») causé par la molécule B (« coupable »), et inversement pour INT_{BA} . $EC_{50,INT AB}$ et $EC_{50,INT BA}$ représentent les puissances d'interaction et $\gamma_{INT,A}$ et $\gamma_{INT,B}$ les paramètres de sigmoïdité des effets d'interaction. Le paramètre INT peut prendre des valeurs comprises entre -1 et ∞ et guide la direction de l'interaction PD : une valeur de 0 suggère aucune interaction entre les deux molécules, une valeur négative indique une augmentation de la puissance et une valeur positive une diminution de la puissance causée par l'interaction entre les deux molécules. Si les deux valeurs de INT sont comprises entre -1 et 0, une synergie est observée tandis que si les deux valeurs de INT sont positives, un antagonisme est observé. Des valeurs de INT de polarités différentes indiquent une interaction asymétrique avec une synergie et/ou un antagonisme dépendant de la concentration des molécules.

Le modèle GPDI peut être étendu pour quantifier les interactions entre plus de deux molécules en incluant des termes supplémentaires du modèle GPDI sur chaque paramètre PD pour chaque molécule supplémentaire. Par exemple, pour trois molécules A, B et C associées, l'effet de la molécule A est formulé comme suit :

$$E_A = \frac{E_{max,A} \cdot a^{Y_A}}{\left(EC_{50,A} \cdot \left(1 + \frac{INT_{AB} \cdot b^{Y_{INT,B}}}{EC_{50,INT AB}^{Y_{INT,B}} + b^{Y_{INT,B}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{INT_{AC} \cdot c^{Y_{INT,C}}}{EC_{50,INT AC}^{Y_{INT,C}} + c^{Y_{INT,C}}} \right) \right)^{Y_A} + a^{Y_A}}$$

(Équation 19)

Le modèle GPDI peut également être appliqué sur le paramètre E_{max} plutôt que sur l' EC_{50} mais dans ce cas la polarité du paramètre INT est inversée. Ainsi, en quantifiant les interactions au niveau des paramètres PD tels que EC_{50} et E_{max} , le modèle GPDI est compatible avec les critères d'additivité couramment utilisés comme l'additivité de Loewe, l'indépendance de Bliss et l'addition simple des effets et peut donc être facilement intégré dans les équations 4, 6 et 13. Ce modèle a récemment été utilisé pour évaluer les interactions PD entre quatre antituberculeux (rifampicine, isoniazide, éthambutol et pyrazinamide) chez des souris infectées par *Mycobacterium tuberculosis* (246). Le modèle a alors permis d'identifier des interactions antagonistes entre la rifampicine et l'isoniazide, et des interactions synergiques entre la rifampicine et l'éthambutol. En revanche aucune interaction avec la pyrazinamide n'a été caractérisée.

Une étude comparant le modèle d'interaction de Bliss, le modèle de Greco et le modèle GPDI a conclu que les approches conventionnelles basées sur l'indépendance de Bliss et l'additivité de Loewe pouvaient mener à des conclusions différentes en ce qui concerne la synergie et l'antagonisme de l'interaction observée et ne permettaient pas de décrire les données observées aussi bien que le modèle GPDI (245).

3. Autres fonctions d'interaction

L'interaction de deux molécules peut également être évaluée avec un modèle plus simple. Une **fonction puissance** a, par exemple, été utilisé pour décrire l'interaction entre le méropénème et la colistine contre des souches de *P. aeruginosa* (247) :

$$E = E_{MER} \left(1 + \frac{E_{COL}}{E_{COL} + E_{MER}} \right)^{Int} + E_{COL} \left(1 + \frac{E_{MER}}{E_{MER} + E_{COL}} \right)^{Int}$$

(Équation 20)

Où E est l'effet combiné résultant de l'association des deux molécules, E_{MER} et E_{COL} sont les effets du méropénème seul et de la colistine seule respectivement (caractérisés soit par un modèle E_{max} sigmoïde soit par un modèle linéaire), et Int est le paramètre d'interaction déterminant l'influence des molécules l'une sur l'autre. Dans cette étude, un même paramètre Int a été estimé pour les deux antibiotiques. Pour la souche sauvage, un paramètre d'interaction égal à -2.6 a été estimé, suggérant un effet antagoniste tandis qu'un effet synergique a été estimé pour la souche résistante, avec un paramètre d'interaction égal à 1.3.

Enfin, plusieurs modèles d'interaction ont permis de caractériser la synergie entre deux molécules en définissant simplement un changement de la valeur d' E_{max} ou EC_{50} d'une des molécules en fonction de la présence (200, 248) ou de la concentration de la deuxième (199, 201, 214, 249). Par exemple, Ly *et al.* a estimé que l'effet bactéricide maximum du doripénème (E_{max}) augmentait de façon linéaire avec l'augmentation des concentrations de polymyxine B (200). Dans un autre modèle, l'interaction synergique entre les aminoglycosides et l'imipénème, basée sur l'hypothèse que les aminoglycosides pourraient augmenter la pénétration de l'imipénème de par la rupture de la membrane externe, a été prise en compte en estimant une plus faible valeur d' EC_{50} de l'imipénème quand la concentration d'aminoglycoside associée était au moins égale à 4 mg/L (199). Dans le cas des associations ATM-AVI (214) et ceftazidime-AVI (215), une fonction bi-exponentielle décrivant la relation entre la concentration d'AVI et la puissance (EC_{50}) de l'antibiotique associé a été utilisée.

Annexe 2 : Autorisations de reproduction des figures

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 25, 2018

This Agreement between Mrs. Alexia Chauzy ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4374300433744
License date	Jun 22, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Drug Resistance Updates
Licensed Content Title	An update on β -lactamase inhibitor discovery and development
Licensed Content Author	Jean-Denis Docquier, Stefano Mangani
Licensed Content Date	Jan 1, 2018
Licensed Content Volume	36
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	17
Start Page	13
End Page	29
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	French
Original figure numbers	figures 1 and 2
Title of your thesis/dissertation	Evaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique in vitro/in vivo de l'association aztreonam-avibactam
Expected completion date	Sep 2018
Estimated size (number of pages)	200
Requestor Location	Mrs. Alexia Chauzy 10 rue du Télégraphe Croutelle, 86240 France Attn: Mrs. Alexia Chauzy
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

**OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 26, 2018

This Agreement between Mrs. Alexia Chauzy ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	4390130605473
License date	Jul 15, 2018
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Clinical Infectious Diseases
Licensed content title	Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men
Licensed content author	Craig, William A.
Licensed content date	Jan 1, 1998
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	Evaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique in vitro/in vivo de l'association aztreonam-avibactam
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Sep 2018
Permissions cost	0.00 EUR
Value added tax	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Title	Evaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique in vitro/in vivo de l'association aztreonam-avibactam
Instructor name	n/a
Institution name	n/a
Expected presentation date	Sep 2018
Portions	Figure 4.
Specific Languages	Français
Requestor Location	Mrs. Alexia Chauzy 10 rue du Télégraphe Croutelle, 86240 France Attn: Mrs. Alexia Chauzy
Publisher Tax ID	GB125506730
Billing Type	Invoice
Billing Address	Mrs. Alexia Chauzy 10 rue du Télégraphe Croutelle, France 86240 Attn: Mrs. Alexia Chauzy
Total	0.00 EUR

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 26, 2018

This Agreement between Mrs. Alexia Chauzy ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4390821091771
License date	Jul 16, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Clinical Microbiology and Infection
Licensed Content Title	The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach
Licensed Content Author	J.W. Mouton,D.F.J. Brown,P. Apfalter,R. Cantón,C.G. Giske,M. Ivanova,A.P. MacGowan,A. Rodloff,C.-J. Soussy,M. Steinbakk,G. Kahlmeter
Licensed Content Date	Mar 1, 2012
Licensed Content Volume	18
Licensed Content Issue	3
Licensed Content Pages	9
Start Page	E37
End Page	E45
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Français
Original figure numbers	FIG. 4.
Title of your thesis/dissertation	Evaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique in vitro/in vivo de l'association aztreonam-avibactam
Expected completion date	Sep 2018
Estimated size (number of pages)	200
Requestor Location	Mrs. Alexia Chauzy 10 rue du Télégraphe Croutelle, 86240 France Attn: Mrs. Alexia Chauzy
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

**OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 10, 2018

This Agreement between Mrs. Alexia Chauzy ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	4405460071302
License date	Aug 10, 2018
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Journal of Antimicrobial Chemotherapy
Licensed content title	Pharmacokinetics/pharmacodynamics of a β -lactam and β -lactamase inhibitor combination: a novel approach for aztreonam/avibactam
Licensed content author	Singh, Renu; Kim, Arjun
Licensed content date	May 29, 2015
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	Evaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique in vitro/in vivo de l'association aztreonam-avibactam
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Sep 2018
Permissions cost	0.00 EUR
Value added tax	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Title	Evaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique in vitro/in vivo de l'association aztreonam-avibactam
Instructor name	n/a
Institution name	n/a
Expected presentation date	Sep 2018
Portions	Figure 2. Figure 4.
Specific Languages	français
Requestor Location	Mrs. Alexia Chauzy 10 rue du Télégraphe
	Croutelle, 86240 France Attn: Mrs. Alexia Chauzy
Publisher Tax ID	GB125506730
Billing Type	Invoice
Billing Address	Mrs. Alexia Chauzy 10 rue du Télégraphe
	Croutelle, France 86240 Attn: Mrs. Alexia Chauzy
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

REFERENCES

1. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current opinion in microbiology*. 2005;8(5):525-33.
2. World Health Organization (WHO). De nouvelles données révèlent l'existence de niveaux élevés de résistance aux antibiotiques dans le monde [Communiqué de presse]. 2018. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/fr/>.
3. World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/fr/>.
4. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(1):160-201.
5. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *The Korean journal of internal medicine*. 2012;27(2):128-42.
6. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(3):1089-94.
7. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(10):5873-84.
8. Johnson L, Sabel A, Burman WJ, Everhart RM, Rome M, MacKenzie TD, et al. Emergence of fluoroquinolone resistance in outpatient urinary *Escherichia coli* isolates. *The American journal of medicine*. 2008;121(10):876-84.
9. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;56(1):52-9.
10. Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ, Courtieu AL, Husson MO, Lemozy J, et al. Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactams in members of the family Enterobacteriaceae: a 3-year survey in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992;36(8):1677-81.
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.
12. Perez F, El Chakhtoura NG, Papp-Wallace KM, Wilson BM, Bonomo RA. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: can we apply "precision medicine" to antimicrobial chemotherapy? *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2016;17(6):761-81.
13. Huttner A, Harbarth S, Carlet J, Cosgrove S, Goossens H, Holmes A, et al. Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2013;2(1):31.
14. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(1):60-7.

15. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infection control and hospital epidemiology*. 2008;29(12):1099-106.
16. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(3):1028-33.
17. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases.
18. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*. 2017;33(3):300-5.
19. Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2017;22(6).
20. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):161-82, Table of Contents.
21. Alby K, Miller MB. Mechanisms and Detection of Antimicrobial Resistance. 2018:1467-78.e4.
22. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(6):1211-33.
23. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(3):969-76.
24. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1980;289(1036):321-31.
25. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;55(6):1050-1.
26. Martinez-Martinez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14 Suppl 1:82-9.
27. Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Medecine et maladies infectieuses*. 2014;44(2):51-6.
28. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013;13(9):785-96.
29. Mojica MF, Bonomo RA, Fast W. B1-Metallo-beta-Lactamases: Where Do We Stand? Current drug targets. 2016;17(9):1029-50.
30. Evans BA, Amyes SG. OXA beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(2):241-63.
31. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;48(1):15-22.
32. Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(4):1059-63.

33. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious diseases*. 2010;10(9):597-602.
34. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(10):1791-8.
35. Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2014;15(10):1351-70.
36. Kelesidis T, Falagas ME. The safety of polymyxin antibiotics. *Expert opinion on drug safety*. 2015;14(11):1687-701.
37. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochemical pharmacology*. 1990;40(11):2383-92.
38. Bogdanovich T, Adams-Haduch JM, Tian GB, Nguyen MH, Kwak EJ, Muto CA, et al. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(4):373-6.
39. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:643.
40. Jiang Y, Shen P, Wei Z, Liu L, He F, Shi K, et al. Dissemination of a clone carrying a fosA3-harboring plasmid mediates high fosfomycin resistance rate of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;45(1):66-70.
41. van Duin D, Cober ED, Richter SS, Perez F, Cline M, Kaye KS, et al. Tigecycline therapy for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) bacteriuria leads to tigecycline resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(12):O1117-20.
42. Zavascki AP, Bulitta JB, Landersdorfer CB. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert review of anti-infective therapy*. 2013;11(12):1333-53.
43. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;55(7):943-50.
44. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouvelekis LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(4):2322-8.
45. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(4):2108-13.
46. Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. Antibiotic combinations: should they be tested? *Clinical microbiology reviews*. 1988;1(2):139-56.
47. Falagas ME, Lourida P, Poulikakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(2):654-63.

48. Farmer TH, Degnan BA, Payne DJ. Penetration of beta-lactamase inhibitors into the periplasm of gram-negative bacteria. *FEMS microbiology letters*. 1999;176(1):11-5.
49. Toussaint KA, Gallagher JC. beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations: from then to now. *The Annals of pharmacotherapy*. 2015;49(1):86-98.
50. Rossolini GM, Docquier JD. New beta-lactamases: a paradigm for the rapid response of bacterial evolution in the clinical setting. *Future microbiology*. 2006;1(3):295-308.
51. Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Canica MM, Vedel G, Nevot P, Krishnamoorthy R, et al. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS microbiology letters*. 1994;120(1-2):75-80.
52. Dubois V, Poirel L, Arpin C, Coulanges L, Bebear C, Nordmann P, et al. SHV-49, a novel inhibitor-resistant beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(11):4466-9.
53. Wagenlehner FM, Umeh O, Steenberg J, Yuan G, Darouiche RO. Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections, including pyelonephritis: a randomised, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cUTI). *The Lancet*. 2015;385(9981):1949-56.
54. Solomkin J, Hershberger E, Miller B, Popejoy M, Friedland I, Steenberg J, et al. Ceftolozane/Tazobactam Plus Metronidazole for Complicated Intra-abdominal Infections in an Era of Multidrug Resistance: Results From a Randomized, Double-Blind, Phase 3 Trial (ASPECT-cIAI). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;60(10):1462-71.
55. Craig WA, Andes DR. In vivo activities of ceftolozane, a new cephalosporin, with and without tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*, including strains with extended-spectrum beta-lactamases, in the thighs of neutropenic mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(4):1577-82.
56. Bulik CC, Christensen H, Nicolau DP. In vitro potency of CXA-101, a novel cephalosporin, against *Pseudomonas aeruginosa* displaying various resistance phenotypes, including multidrug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):557-9.
57. Livermore DM, Mushtaq S, Ge Y, Warner M. Activity of cephalosporin CXA-101 (FR264205) against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* group strains and isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(5):402-6.
58. Livermore DM, Mushtaq S, Ge Y. Checkerboard titration of cephalosporin CXA-101 (FR264205) and tazobactam versus beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(9):1972-4.
59. Crandon JL, Nicolau DP. In Vitro Activity of Cefepime/AAI101 and Comparators against Cefepime Non-susceptible *Enterobacteriaceae*. *Pathogens*. 2015;4(3):620-5.
60. Papp-Wallace KM, Bethel CR, Barnes MD, Rutter JD, Taracila MA, S. B, et al. AAI101, a Novel β -Lactamase Inhibitor: Microbiological and Enzymatic Profiling. *Open Forum Infectious Diseases* 2017;4(Suppl 1):S375.
61. Ramsey C, MacGowan AP. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(10):2704-12.
62. Georgopapadakou NH, Smith SA, Sykes RB. Mode of action of azthreonam. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1982;21(6):950-6.

63. Biedenbach DJ, Kazmierczak K, Bouchillon SK, Sahm DF, Bradford PA. In vitro activity of aztreonam-avibactam against a global collection of Gram-negative pathogens from 2012 and 2013. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(7):4239-48.
64. Boucher BA. Role of aztreonam in the treatment of nosocomial pneumonia in the critically ill surgical patient. *American journal of surgery*. 2000;179(2 Suppl 1):45-50.
65. Hellinger WC, Brewer NS. Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clinic proceedings*. 1999;74(4):420-34.
66. Parry MF. Aztreonam susceptibility testing. A retrospective analysis. *The American journal of medicine*. 1990;88(3C):7S-11S; discussion 38S-42S.
67. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2005;11 Suppl 6:2-9.
68. Lohans CT, Brem J, Schofield CJ. New Delhi Metallo-beta-Lactamase 1 Catalyzes Avibactam and Aztreonam Hydrolysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(12).
69. Berne TV, Yellin AE, Appleman MD, Gill MA, Chenella FC, Heseltine PN. Surgically treated gangrenous or perforated appendicitis. A comparison of aztreonam and clindamycin versus gentamicin and clindamycin. *Annals of surgery*. 1987;205(2):133-7.
70. Urabe A, Takaku F, Mizoguchi H, Nomura T, Aoki N, Yamaguchi H, et al. [Combination therapy with aztreonam and clindamycin on severe infections accompanying neutropenic patients with hematological disorders]. *The Japanese journal of antibiotics*. 1990;43(10):1713-22.
71. LaPlante KL, Sakoulas G. Evaluating aztreonam and ceftazidime pharmacodynamics with *Escherichia coli* in combination with daptomycin, linezolid, or vancomycin in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(10):4549-55.
72. Kirkby S, Novak K, McCoy K. Aztreonam (for inhalation solution) for the treatment of chronic lung infections in patients with cystic fibrosis: an evidence-based review. *Core evidence*. 2011;6:59-66.
73. Coleman K. Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non-beta-lactam beta-lactamase inhibitors. *Current opinion in microbiology*. 2011;14(5):550-5.
74. Drawz SM, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New beta-lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(4):1835-46.
75. Docquier JD, Mangani S. An update on beta-lactamase inhibitor discovery and development. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2018;36:13-29.
76. Ehmann DE, Jahic H, Ross PL, Gu RF, Hu J, Durand-Reville TF, et al. Kinetics of avibactam inhibition against Class A, C, and D beta-lactamases. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(39):27960-71.
77. Stachyra T, Levasseur P, Pechereau MC, Girard AM, Claudon M, Miossec C, et al. In vitro activity of the {beta}-lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and Enterobacteriaceae expressing KPC carbapenemases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;64(2):326-9.
78. Stachyra T, Pechereau MC, Bruneau JM, Claudon M, Frere JM, Miossec C, et al. Mechanistic studies of the inactivation of TEM-1 and P99 by NXL104, a novel non-beta-lactam beta-lactamase inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(12):5132-8.

79. Morinaka A, Tsutsumi Y, Yamada M, Suzuki K, Watanabe T, Abe T, et al. OP0595, a new diazabicyclooctane: mode of action as a serine beta-lactamase inhibitor, antibiotic and beta-lactam 'enhancer'. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(10):2779-86.
80. Bonnefoy A, Dupuis-Hamelin C, Steier V, Delachaume C, Seys C, Stachyra T, et al. In vitro activity of AVE1330A, an innovative broad-spectrum non-beta-lactam beta-lactamase inhibitor. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;54(2):410-7.
81. Lagace-Wiens PR, Tailor F, Simner P, DeCorby M, Karlowsky JA, Walkty A, et al. Activity of NXL104 in combination with beta-lactams against genetically characterized *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing class A extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(5):2434-7.
82. Berkhout J, Melchers MJ, van Mil AC, Nichols WW, Mouton JW. In vitro activity of ceftazidime-avibactam combination in in vitro checkerboard assays. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(2):1138-44.
83. Asli A, Brouillette E, Krause KM, Nichols WW, Malouin F. Distinctive Binding of Avibactam to Penicillin-Binding Proteins of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(2):752-6.
84. Karlowsky JA, Adam HJ, Baxter MR, Lagace-Wiens PR, Walkty AJ, Hoban DJ, et al. In vitro activity of ceftaroline-avibactam against gram-negative and gram-positive pathogens isolated from patients in Canadian hospitals from 2010 to 2012: results from the CANWARD surveillance study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(11):5600-11.
85. Levasseur P, Girard AM, Miossec C, Pace J, Coleman K. In vitro antibacterial activity of the ceftazidime-avibactam combination against enterobacteriaceae, including strains with well-characterized beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(4):1931-4.
86. Sy SK, Zhuang L, Beaudoin ME, Kircher P, Tabosa MA, Cavalcanti NC, et al. Potentiation of ceftazidime by avibactam against beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro infection model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(4):1109-17.
87. Louie A, Castanheira M, Liu W, Grasso C, Jones RN, Williams G, et al. Pharmacodynamics of beta-lactamase inhibition by NXL104 in combination with ceftaroline: examining organisms with multiple types of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(1):258-70.
88. Vasoo S, Cunningham SA, Cole NC, Kohner PC, Menon SR, Krause KM, et al. In Vitro Activities of Ceftazidime-Avibactam, Aztreonam-Avibactam, and a Panel of Older and Contemporary Antimicrobial Agents against Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(12):7842-6.
89. Papp-Wallace KM, Bajaksouzian S, Abdelhamed AM, Foster AN, Winkler ML, Gatta JA, et al. Activities of ceftazidime, ceftaroline, and aztreonam alone and combined with avibactam against isogenic *Escherichia coli* strains expressing selected single beta-lactamases. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2015;82(1):65-9.
90. Wiskirchen DE, Crandon JL, Furtado GH, Williams G, Nicolau DP. In vivo efficacy of a human-simulated regimen of ceftaroline combined with NXL104 against extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL)-producing and non-ESBL-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(7):3220-5.
91. Levasseur P, Girard AM, Lavallade L, Miossec C, Pace J, Coleman K. Efficacy of a Ceftazidime-Avibactam combination in a murine model of Septicemia caused by Enterobacteriaceae species producing ampc or extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(11):6490-5.

92. Berkhout J, Melchers MJ, van Mil AC, Seyedmousavi S, Lagarde CM, Schuck VJ, et al. Pharmacodynamics of Ceftazidime and Avibactam in Neutropenic Mice with Thigh or Lung Infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(1):368-75.
93. Crandon JL, Nicolau DP. Human simulated studies of aztreonam and aztreonam-avibactam to evaluate activity against challenging gram-negative organisms, including metallo-beta-lactamase producers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(7):3299-306.
94. Mushtaq S, Warner M, Williams G, Critchley I, Livermore DM. Activity of checkerboard combinations of ceftaroline and NXL104 versus beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(7):1428-32.
95. Carmeli Y, Armstrong J, Laud PJ, Newell P, Stone G, Wardman A, et al. Ceftazidime-avibactam or best available therapy in patients with ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* complicated urinary tract infections or complicated intra-abdominal infections (REPRISE): a randomised, pathogen-directed, phase 3 study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(6):661-73.
96. Torres A, Zhong N, Pachl J, Timsit J-F, Kollef M, Chen Z, et al. Ceftazidime-avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia (REPROVE): a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018;18(3):285-95.
97. Forest Laboratories. Comparative Study of Coadministered Ceftaroline Fosamil and NXL104 vs. Intravenous Doripenem in Adult Subjects With Complicated Urinary Tract Infections. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01281462>. Accessed January 2, 2014. .
98. Pfizer. A Study to Investigate the Effect of Administration of Ceftazidime-avibactam (CAZ-AVI) and Ceftaroline Fosamil -Avibactam (CXL) on the Intestinal Flora of Healthy Volunteers. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01789528>. Accessed September 5, 2017.
99. Castanheira M, Sader HS, Farrell DJ, Mendes RE, Jones RN. Activity of ceftaroline-avibactam tested against Gram-negative organism populations, including strains expressing one or more beta-lactamases and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying various staphylococcal cassette chromosome mec types. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(9):4779-85.
100. Pfizer. Determine the PK and Safety and Tolerability of ATM-AVI for the Treatment of cIAIs in Hospitalized Adults (REJUVENATE). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02655419>. Accessed November 17, 2017.
101. Pfizer. A Study to Determine the Efficacy, Safety and Tolerability of Aztreonam-Avibactam (ATM-AVI) ± Metronidazole (MTZ) Versus Meropenem (MER) ± Colistin (COL) for the Treatment of Serious Infections Due to Gram Negative Bacteria. (REVISIT). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03329092>. Accessed February 21, 2018.
102. Canton R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14 Suppl 1:53-62.
103. Humphries RM, Yang S, Hemarajata P, Ward KW, Hindler JA, Miller SA, et al. First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing *Klebsiella pneumoniae* Isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(10):6605-7.
104. Nelson K, Hemarajata P, Sun D, Rubio-Aparicio D, Tsivkovski R, Yang S, et al. Resistance to Ceftazidime-Avibactam Is Due to Transposition of KPC in a Porin-Deficient Strain of *Klebsiella pneumoniae* with Increased Efflux Activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(10).

105. Shields RK, Chen L, Cheng S, Chavda KD, Press EG, Snyder A, et al. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(3).
106. Shields RK, Potoski BA, Haidar G, Hao B, Doi Y, Chen L, et al. Clinical Outcomes, Drug Toxicity, and Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Among Patients Treated for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2016;63(12):1615-8.
107. Giddins MJ, Macesic N, Annavajhala MK, Stump S, Khan S, McConville TH, et al. Successive Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance through Distinct Genomic Adaptations in blaKPC-2-Harboring *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 Isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(3).
108. Winkler ML, Papp-Wallace KM, Taracila MA, Bonomo RA. Avibactam and inhibitor-resistant SHV beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(7):3700-9.
109. Livermore DM, Mushtaq S, Barker K, Hope R, Warner M, Woodford N. Characterization of beta-lactamase and porin mutants of Enterobacteriaceae selected with ceftaroline + avibactam (NXL104). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(6):1354-8.
110. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S. Activity of MK-7655 combined with imipenem against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(10):2286-90.
111. Hirsch EB, Ledesma KR, Chang KT, Schwartz MS, Motyl MR, Tam VH. In vitro activity of MK-7655, a novel beta-lactamase inhibitor, in combination with imipenem against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(7):3753-7.
112. Young K, Hackel M, Lascols C, Bouchillon S, Badal R, Martinez-Martinez L, et al. Response to imipenem plus MK-7655, a novel beta-lactamase inhibitor, among 212 recent clinical isolates of *P. aeruginosa*. Paper presented at: IDWeek 2012 Annual Meeting; October 16-21, 2012; San Francisco, CA. .
113. Lucasti C, Vasile L, Sandesc D, Venskutonis D, McLeroth P, Lala M, et al. Phase 2, Dose-Ranging Study of Relebactam with Imipenem-Cilastatin in Subjects with Complicated Intra-abdominal Infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(10):6234-43.
114. Sims M, Mariyanovski V, McLeroth P, Akers W, Lee YC, Brown ML, et al. Prospective, randomized, double-blind, Phase 2 dose-ranging study comparing efficacy and safety of imipenem/cilastatin plus relebactam with imipenem/cilastatin alone in patients with complicated urinary tract infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(9):2616-26.
115. Merck Sharp & Dohme Corp. Efficacy and Safety of Imipenem+Cilastatin/Relebactam (MK-7655A) Versus Colistimethate Sodium + Imipenem+Cilastatin in Imipenem-Resistant Bacterial Infection (MK-7655A-013) (RESTORE-IMI 1). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02452047>. Accessed September 28, 2017.
116. Merck Sharp & Dohme Corp. Imipenem/Relebactam/Cilastatin Versus Piperacillin/Tazobactam for Treatment of Participants With Bacterial Pneumonia (MK-7655A-014) (RESTORE-IMI 2). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02493764>. Accessed May 10, 2018.
117. Merck Sharp & Dohme Corp. Efficacy and Safety of Imipenem+Cilastatin/Relebactam (MK-7655A) in Japanese Participants With Complicated Intra-abdominal Infection or Complicated Urinary Tract Infection (MK-7655A-017). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03293485>. Accessed December 26, 2017.

118. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Woodford N. Interactions of OP0595, a Novel Triple-Action Diazabicyclooctane, with beta-Lactams against OP0595-Resistant Enterobacteriaceae Mutants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(1):554-60.
119. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Woodford N. Activity of OP0595/beta-lactam combinations against Gram-negative bacteria with extended-spectrum, AmpC and carbapenem-hydrolysing beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(11):3032-41.
120. Hoffmann-La Roche. A Study to Investigate the Intrapulmonary Lung Penetration of Nacubactam in Healthy Participants. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03182504>. Accessed April 23, 2018. .
121. Moya B, Barcelo IM, Bhagwat S, Patel M, Bou G, Papp-Wallace KM, et al. WCK 5107 (Zidebactam) and WCK 5153 Are Novel Inhibitors of PBP2 Showing Potent "beta-Lactam Enhancer" Activity against *Pseudomonas aeruginosa*, Including Multidrug-Resistant Metallo-beta-Lactamase-Producing High-Risk Clones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(6).
122. Durand-Reville TF, Guler S, Comita-Prevoir J, Chen B, Bifulco N, Huynh H, et al. ETX2514 is a broad-spectrum beta-lactamase inhibitor for the treatment of drug-resistant Gram-negative bacteria including *Acinetobacter baumannii*. *Nature microbiology*. 2017;2:17104.
123. Shapiro AB, Gao N, Jahic H, Carter NM, Chen A, Miller AA. Reversibility of Covalent, Broad-Spectrum Serine beta-Lactamase Inhibition by the Diazabicyclooctenone ETX2514. *ACS infectious diseases*. 2017;3(11):833-44.
124. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):24-38.
125. Penwell WF, Shapiro AB, Giacobbe RA, Gu RF, Gao N, Thresher J, et al. Molecular mechanisms of sulbactam antibacterial activity and resistance determinants in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(3):1680-9.
126. Lindquist RN, Terry C. Inhibition of subtilisin by boronic acids, potential analogs of tetrahedral reaction intermediates. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1974;160(1):135-44.
127. Kiener PA, Waley SG. Reversible inhibitors of penicillinases. *The Biochemical journal*. 1978;169(1):197-204.
128. Hecker SJ, Reddy KR, Totrov M, Hirst GC, Lomovskaya O, Griffith DC, et al. Discovery of a Cyclic Boronic Acid beta-Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;58(9):3682-92.
129. Lomovskaya O, Sun D, Rubio-Aparicio D, Nelson K, Tsivkovski R, Griffith DC, et al. Vaborbactam: Spectrum of Beta-Lactamase Inhibition and Impact of Resistance Mechanisms on Activity in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(11).
130. Food and Drug Administration (FDA). Division of Anti-Infective Products. Clinical Microbiology Review. 2017. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2017/209776Orig1s000MicroR.pdf.
131. Jorgensen SCJ, Rybak MJ. Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the Battle against Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Pharmacotherapy*. 2018;38(4):444-61.
132. Hackel MA, Lomovskaya O, Dudley MN, Karlowsky JA, Sahm DF. In Vitro Activity of Meropenem-Vaborbactam against Clinical Isolates of KPC-Positive Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(1).

133. Griffith DC, Loutit JS, Morgan EE, Durso S, Dudley MN. Phase 1 Study of the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of the beta-Lactamase Inhibitor Vaborbactam (RPX7009) in Healthy Adult Subjects. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(10):6326-32.
134. Rempex Pharmaceuticals. Safety Study of Intravenous Biapenem (RPX2003) and RPX7009 Given Alone and in Combination. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01772836>. Accessed July 11, 2013.
135. Rempex Pharmaceuticals. Evaluating the Plasma, Epithelial Lining, and Alveolar Macrophage Concentrations of Intravenous Carbavance™ (RPX2014/RPX7009) in Healthy Adult Subjects. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02073812>. Accessed March 5, 2018.
136. Rempex Pharmaceuticals. The Safety and Pharmacokinetics of Carbavance™ (RPX2014/RPX7009) in Subjects With Renal Insufficiency. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02020434>. Accessed March 5, 2018.
137. Rempex Pharmaceuticals. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics of Intravenous RPX2014 and RPX7009 in Healthy Adult Subjects. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01897779>. Accessed April 29, 2014.
138. Kaye KS, Bhowmick T, Metallidis S, Bleasdale SC, Sagan OS, Stus V, et al. Effect of Meropenem-Vaborbactam vs Piperacillin-Tazobactam on Clinical Cure or Improvement and Microbial Eradication in Complicated Urinary Tract Infection: The TANGO I Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2018;319(8):788-99.
139. Rempex Pharmaceuticals. Efficacy, Safety, Tolerability of Carbavance Compared to Best Available Therapy in Serious Infections Due to Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae, in Adults. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02168946>. Accessed March 5, 2018.
140. Hecker SJ, Reddy KR, Glinka TW, Totrov M, Lomovskaya O, Tsivkovski R, et al. Discovery of a New Series of Broad spectrum Carbapenemase Inhibitors (BCIs) with Activity vs Serine and Metallo Beta-lactamases. In: American Society for Microbiology. 55th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC/ICC). ASM Press, San Diego, CA Abstract F-270. 2015.
141. Lomovskaya O, Rubio-Aparicio D, Sun D, Griffith D, Dudley MN. Microbiological Characterization of Novel Broad-Spectrum Inhibitors of Serine and Metallo Carbapenemases. In: American Society for Microbiology. 55th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC/ICC). ASM Press, San Diego, CA Abstract F-264. 2015.
142. Fast W, Sutton LD. Metallo-beta-lactamase: inhibitors and reporter substrates. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1834(8):1648-59.
143. Brem J, van Berkel SS, Zollman D, Lee SY, Gileadi O, McHugh PJ, et al. Structural Basis of Metallo-beta-Lactamase Inhibition by Captopril Stereoisomers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(1):142-50.
144. Klingler FM, Wichelhaus TA, Frank D, Cuesta-Bernal J, El-Delik J, Muller HF, et al. Approved Drugs Containing Thiols as Inhibitors of Metallo-beta-lactamases: Strategy To Combat Multidrug-Resistant Bacteria. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;58(8):3626-30.
145. Gonzalez MM, Kosmopoulou M, Mojica MF, Castillo V, Hinchliffe P, Pettinati I, et al. Bisthiazolidines: A Substrate-Mimicking Scaffold as an Inhibitor of the NDM-1 Carbapenemase. *ACS infectious diseases*. 2015;1(11):544-54.
146. Mojica MF, Mahler SG, Bethel CR, Taracila MA, Kosmopoulou M, Papp-Wallace KM, et al. Exploring the Role of Residue 228 in Substrate and Inhibitor Recognition by VIM Metallo-beta-lactamases. *Biochemistry*. 2015;54(20):3183-96.

147. Ishii Y, Eto M, Mano Y, Tateda K, Yamaguchi K. In vitro potentiation of carbapenems with ME1071, a novel metallo-beta-lactamase inhibitor, against metallo-beta-lactamase- producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(9):3625-9.
148. Livermore DM, Mushtaq S, Morinaka A, Ida T, Maebashi K, Hope R. Activity of carbapenems with ME1071 (disodium 2,3-diethylmaleate) against Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* spp. with carbapenemases, including NDM enzymes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(1):153-8.
149. Yamada K, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, et al. In vivo efficacy of biapenem with ME1071, a novel metallo-beta-lactamase (MBL) inhibitor, in a murine model mimicking ventilator-associated pneumonia caused by MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(3):238-43.
150. Aoki N, Ishii Y, Tateda K, Saga T, Kimura S, Kikuchi Y, et al. Efficacy of calcium-EDTA as an inhibitor for metallo-beta-lactamase in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(11):4582-8.
151. King AM, Reid-Yu SA, Wang W, King DT, De Pascale G, Strynadka NC, et al. Aspergillomarasmine A overcomes metallo-beta-lactamase antibiotic resistance. *Nature*. 2014;510(7506):503-6.
152. Falconer SB, Reid-Yu SA, King AM, Gehrke SS, Wang W, Britten JF, et al. Zinc Chelation by a Small-Molecule Adjuvant Potentiates Meropenem Activity in Vivo against NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *ACS infectious diseases*. 2015;1(11):533-43.
153. Chiou J, Wan S, Chan KF, So PK, He D, Chan EW, et al. Ebselen as a potent covalent inhibitor of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1). *Chemical communications*. 2015;51(46):9543-6.
154. Azad GK, Tomar RS. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. *Molecular biology reports*. 2014;41(8):4865-79.
155. Christopeit T, Albert A, Leiros HS. Discovery of a novel covalent non-beta-lactam inhibitor of the metallo-beta-lactamase NDM-1. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2016;24(13):2947-53.
156. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Discussion Document E. Dis 5.1: determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2003;9:1-7.
157. Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: a step toward model-based dose optimization. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(10):4619-30.
158. Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. The effective concentrations of penicillin in vitro and in vivo for streptococci, pneumococci, and *Treponema pallidum*. *Journal of bacteriology*. 1950;59(5):625-43.
159. Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin; importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels. *The American journal of medicine*. 1950;9(3):280-99.
160. Eagle H, Fleischman R, Levy M. "Continuous" vs. "discontinuous" therapy with penicillin; the effect of the interval between injections on therapeutic efficacy. *The New England journal of medicine*. 1953;248(12):481-8.

161. Eagle H, Fleischman R, Levy M. On the duration of penicillin action in relation to its concentration in the serum. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1953;41(1):122-32.
162. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1998;26(1):1-10; quiz 1-2.
163. Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *The Journal of infectious diseases*. 1988;158(4):831-47.
164. Craig WA. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of β -lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2003;17(3):479-501.
165. Dudhani RV, Turnidge JD, Coulthard K, Milne RW, Rayner CR, Li J, et al. Elucidation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic determinant of colistin activity against *Pseudomonas aeruginosa* in murine thigh and lung infection models. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(3):1117-24.
166. Nielsen EI, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacological reviews*. 2013;65(3):1053-90.
167. Drusano GL, Preston SL, Hardalo C, Hare R, Banfield C, Andes D, et al. Use of preclinical data for selection of a phase II/III dose for evernimicin and identification of a preclinical MIC breakpoint. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(1):13-22.
168. Ambrose PG, Meagher AK, Passarell JA, Van Wart SA, Cirincione BB, Rubino CM, et al. Use of a clinically derived exposure-response relationship to evaluate potential tigecycline-Enterobacteriaceae susceptibility breakpoints. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009;63(1):38-42.
169. Mouton JW, Brown DF, Apfalter P, Canton R, Giske CG, Ivanova M, et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(3):E37-45.
170. EMA. Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antibacterial medicinal products. 2016.
171. Tam VH, Louie A, Deziel MR, Liu W, Drusano GL. The relationship between quinolone exposures and resistance amplification is characterized by an inverted U: a new paradigm for optimizing pharmacodynamics to counterselect resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(2):744-7.
172. Gloede J, Scheerans C, Derendorf H, Kloft C. In vitro pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(2):186-201.
173. Sy SKB, Derendorf H. Pharmacometrics in Bacterial Infections. 2014;14:229-58.
174. Garrett ER, Miller GH, Brown MR. Kinetics and mechanisms of action of antibiotics on microorganisms. V. Chloramphenicol and tetracycline affected *Escherichia coli* generation rates. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1966;55(6):593-600.
175. Grasso S, Meinardi G, de Carneri I, Tamassia V. New in vitro model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1978;13(4):570-6.

176. Barclay ML, Begg EJ, Chambers ST. Adaptive resistance following single doses of gentamicin in a dynamic in vitro model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992;36(9):1951-7.
177. Lowdin E, Odenholt I, Bengtsson S, Cars O. Pharmacodynamic effects of sub-MICs of benzylpenicillin against *Streptococcus pyogenes* in a newly developed in vitro kinetic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996;40(11):2478-82.
178. Toothaker RD, Welling PG, Craig WA. An in vitro model for the study of antibacterial dosage regimen design. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1982;71(8):861-4.
179. Garrison MW, Vance-Bryan K, Larson TA, Toscano JP, Rotschafer JC. Assessment of effects of protein binding on daptomycin and vancomycin killing of *Staphylococcus aureus* by using an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1990;34(10):1925-31.
180. Campion JJ, Chung P, McNamara PJ, Titlow WB, Evans ME. Pharmacodynamic modeling of the evolution of levofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(6):2189-99.
181. Zinner SH, Gilbert D, Lubenko IY, Greer K, Firsov AA. Selection of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in an in vitro dynamic model: protective effect of doxycycline. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;61(3):629-35.
182. Drusano GL, Bonomo RA, Bahniuk N, Bulitta JB, Vanscoy B, Defiglio H, et al. Resistance emergence mechanism and mechanism of resistance suppression by tobramycin for cefepime for *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(1):231-42.
183. Rath C, Lee RE, Meibohm B. Translational PK/PD of anti-infective therapeutics. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2016;21-22:41-9.
184. Venisse N, Gregoire N, Marliat M, Couet W. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic models of in vitro fungistatic and fungicidal effects against *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(3):937-43.
185. Katsube T, Yano Y, Yamano Y, Munekage T, Kuroda N, Takano M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation for bactericidal effect in an in vitro dynamic model. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2008;97(9):4108-17.
186. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(3):450-70.
187. Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology research & perspectives*. 2015;3(3):e00149.
188. Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3558-62.
189. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Gismondo MR. In vitro evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. *BMC infectious diseases*. 2007;7:111.
190. Greco WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological reviews*. 1995;47(2):331-85.
191. Doern CD. When Does 2 Plus 2 Equal 5? A Review of Antimicrobial Synergy Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(12):4124-8.
192. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2002;44(4):363-6.

193. Couet W. Pharmacokinetics/pharmacodynamics characterization of combined antimicrobial agents: a real challenge and an urgent need. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018;24(7):687-8.
194. Mouton JW, van Ogtrop ML, Andes D, Craig WA. Use of pharmacodynamic indices to predict efficacy of combination therapy in vivo. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(10):2473-8.
195. Bulitta JB, Landersdorfer CB, Forrest A, Brown SV, Neely MN, Tsuji BT, et al. Relevance of pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling to clinical care of critically ill patients. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2011;12(12):2044-61.
196. Brill MJE, Kristofferson AN, Zhao C, Nielsen EI, Friberg LE. Semi-mechanistic pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antibiotic drug combinations. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2017.
197. Wicha SG, Huisinga W, Kloft C. Translational Pharmacometric Evaluation of Typical Antibiotic Broad-Spectrum Combination Therapies Against *Staphylococcus Aureus* Exploiting In Vitro Information. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*. 2017;6(8):512-22.
198. Landersdorfer CB, Ly NS, Xu H, Tsuji BT, Bulitta JB. Quantifying subpopulation synergy for antibiotic combinations via mechanism-based modeling and a sequential dosing design. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(5):2343-51.
199. Yadav R, Landersdorfer CB, Nation RL, Boyce JD, Bulitta JB. Novel approach to optimize synergistic carbapenem-aminoglycoside combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(4):2286-98.
200. Ly NS, Bulman ZP, Bulitta JB, Baron C, Rao GG, Holden PN, et al. Optimization of Polymyxin B in Combination with Doripenem To Combat Mutator *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(5):2870-80.
201. Yadav R, Bulitta JB, Nation RL, Landersdorfer CB. Optimization of Synergistic Combination Regimens against Carbapenem- and Aminoglycoside-Resistant Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates via Mechanism-Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(1).
202. Zhuang L, Sy SK, Xia H, Singh RP, Mulder MB, Liu C, et al. Evaluation of in vitro synergy between vertilmicin and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* using a semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45(2):151-60.
203. Vanscoy B, Mendes RE, McCauley J, Bhavnani SM, Bulik CC, Okusanya OO, et al. Pharmacological basis of beta-lactamase inhibitor therapeutics: tazobactam in combination with Cefotolozane. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(12):5924-30.
204. Singh R, Kim A, Tanudra MA, Harris JJ, McLaughlin RE, Patey S, et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of a beta-lactam and beta-lactamase inhibitor combination: a novel approach for aztreonam/avibactam. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(9):2618-26.
205. VanScoy BD, Trang M, McCauley J, Conde H, Bhavnani SM, Friedrich LV, et al. Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of a Novel beta-Lactamase Inhibitor, CB-618, in Combination with Meropenem in an In Vitro Infection Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(7):3891-6.

206. Nicasio AM, VanScoy BD, Mendes RE, Castanheira M, Bulik CC, Okusanya OO, et al. Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of Tazobactam in Combination with Piperacillin in an In Vitro Infection Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(4):2075-80.
207. Nichols WW, Newell P, Critchley IA, Riccobene T, Das S. Avibactam Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Targets. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(6).
208. Coleman K, Levasseur P, Girard AM, Borgonovi M, Miossec C, Merdjan H, et al. Activities of ceftazidime and avibactam against beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a hollow-fiber pharmacodynamic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(6):3366-72.
209. Mavridou E, Melchers RJ, van Mil AC, Mangin E, Motyl MR, Mouton JW. Pharmacodynamics of imipenem in combination with beta-lactamase inhibitor MK7655 in a murine thigh model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(2):790-5.
210. Bensman TJ, Wang J, Jayne J, Fukushima L, Rao AP, D'Argenio DZ, et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Target Attainment Analyses To Determine Optimal Dosing of Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Acute Pulmonary Exacerbations in Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(10).
211. Xiao AJ, Caro L, Popejoy MW, Huntington JA, Kullar R. PK/PD Target Attainment With Ceftolozane/Tazobactam Using Monte Carlo Simulation in Patients With Various Degrees of Renal Function, Including Augmented Renal Clearance and End-Stage Renal Disease. *Infectious diseases and therapy*. 2017;6(1):137-48.
212. Das S, Nichols WW, Li J. Dose selection of ceftazidime-avibactam in patients with nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia, based on preclinical efficacy, preclinical pharmacokinetic/pharmacodynamic and clinical pharmacokinetic data. Poster P1288. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Copenhagen, Denmark. 2015.
213. Sy SKB, Derendorf H. Experimental design and modelling approach to evaluate efficacy of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2017.
214. Sy S, Zhuang L, Xia H, Beaudoin ME, Schuck VJ, Derendorf H. Prediction of in vivo and in vitro infection model results using a semimechanistic model of avibactam and aztreonam combination against multidrug resistant organisms. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*. 2017;6(3):197-207.
215. Sy SKB, Zhuang L, Xia H, Beaudoin ME, Schuck VJ, Nichols WW, et al. A mathematical model-based analysis of the time-kill kinetics of ceftazidime/avibactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018.
216. Dahyot-Fizelier C, Lefeuvre S, Laksiri L, Marchand S, Sawchuk RJ, Couet W, et al. Kinetics of imipenem distribution into the peritoneal fluid of patients with severe peritonitis studied by microdialysis. *Clinical pharmacokinetics*. 2010;49(5):323-34.
217. Karjagin J, Lefeuvre S, Oselin K, Kipper K, Marchand S, Tikkerberi A, et al. Pharmacokinetics of meropenem determined by microdialysis in the peritoneal fluid of patients with severe peritonitis associated with septic shock. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008;83(3):452-9.
218. Lefeuvre S, Marchand S, Lamarche I, Mimoz O, Couet W. Microdialysis study of imipenem distribution in the intraperitoneal fluid of rats with or without experimental peritonitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(1):34-7.

219. Lefeuvre S, Marchand S, Pariat C, Lamarche I, Couet W. Microdialysis study of imipenem distribution in the peritoneal fluid of rats with experimental acute pancreatitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(4):1516-8.
220. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(10):854-65.
221. Montravers P, Morazin F, Cargeac A. Péritonites. EMC - Anesthésie-Réanimation. 2005;2(3):167-84.
222. Nichols WW, Newell P, Critchley I, Riccobene T, Das S. Avibactam Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Targets. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018.
223. European Medicines Agency. Zavicefta. European public assessment report. European Medicines Agency, London, United Kingdom. 2016. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Public_assessment_report/human/004027/WC500210236.pdf.
224. Vinks AA, van Rossem RN, Mathot RA, Heijerman HG, Mouton JW. Pharmacokinetics of aztreonam in healthy subjects and patients with cystic fibrosis and evaluation of dose-exposure relationships using monte carlo simulation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(9):3049-55.
225. Bradford PA, Sanders CC. Use of a predictor panel to evaluate susceptibility test methods proposed for piperacillin-tazobactam. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993;37(12):2578-83.
226. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. .
227. Bhagunde P, Chang KT, Hirsch EB, Ledesma KR, Nikolaou M, Tam VH. Novel modeling framework to guide design of optimal dosing strategies for beta-lactamase inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(5):2237-40.
228. Sadiq MW, Nielsen EI, Khachman D, Conil JM, Georges B, Houin G, et al. A whole-body physiologically based pharmacokinetic (WB-PBPK) model of ciprofloxacin: a step towards predicting bacterial killing at sites of infection. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2017;44(2):69-79.
229. Guo B, Abdelraouf K, Ledesma KR, Chang KT, Nikolaou M, Tam VH. Quantitative impact of neutrophils on bacterial clearance in a murine pneumonia model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(10):4601-5.
230. Drusano GL, Fregeau C, Liu W, Brown DL, Louie A. Impact of burden on granulocyte clearance of bacteria in a mouse thigh infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(10):4368-72.
231. Diep JK, Forrest A, Krzyzanski W, Van Hasselt C, Russo TA, Rao GG. Host-pathogen interactions: a mechanism-based disease progression model to describe the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. In: 26th PAGE meeting. Abstract C-02. 2017.
232. Lorian V. Differences between in vitro and in vivo studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1988;32(10):1600-1.
233. Odenholt I, Lowdin E, Cars O. Pharmacodynamic effects of telavancin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in the presence of human albumin or serum and in an in vitro kinetic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(9):3311-6.

234. Dudley MN, Blaser J, Gilbert D, Zinner SH. Significance of "extravascular" protein binding for antimicrobial pharmacodynamics in an in vitro capillary model of infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1990;34(1):98-101.
235. Gregoire N, Raheison S, Grignon C, Comets E, Marliat M, Ploy MC, et al. Semimechanistic pharmacokinetic-pharmacodynamic model with adaptation development for time-kill experiments of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(6):2379-84.
236. Bulitta JB, Yang JC, Yohonn L, Ly NS, Brown SV, D'Hondt RE, et al. Attenuation of colistin bactericidal activity by high inoculum of *Pseudomonas aeruginosa* characterized by a new mechanism-based population pharmacodynamic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(5):2051-62.
237. Mouton JW, Vinks AA, Punt NC. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997;41(4):733-8.
238. Nolting A, Dalla Costa T, Rand KH, Derendorf H. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antibiotic effect of piperacillin in vitro. *Pharmaceutical research*. 1996;13(1):91-6.
239. Mohamed AF, Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic model for gentamicin and its adaptive resistance with predictions of dosing schedules in newborn infants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(1):179-88.
240. Sy SK, Beaudoin ME, Zhuang L, Loblein KI, Lux C, Kissel M, et al. In vitro pharmacokinetics/pharmacodynamics of the combination of avibactam and aztreonam against MDR organisms. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(7):1866-80.
241. Merdjan H, Rangaraju M, Tarral A. Safety and pharmacokinetics of single and multiple ascending doses of avibactam alone and in combination with ceftazidime in healthy male volunteers: results of two randomized, placebo-controlled studies. *Clinical drug investigation*. 2015;35(5):307-17.
242. Bliss CI. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*. 1939;26(3):585-615.
243. Loewe S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung*. 1953;3(6):285-90.
244. Cokol M, Chua HN, Tasan M, Mutlu B, Weinstein ZB, Suzuki Y, et al. Systematic exploration of synergistic drug pairs. *Molecular systems biology*. 2011;7:544.
245. Wicha SG, Chen C, Clewe O, Simonsson USH. A general pharmacodynamic interaction model identifies perpetrators and victims in drug interactions. *Nature communications*. 2017;8(1):2129.
246. Chen C, Wicha SG, de Knecht GJ, Ortega F, Alameda L, Sousa V, et al. Assessing Pharmacodynamic Interactions in Mice Using the Multistate Tuberculosis Pharmacometric and General Pharmacodynamic Interaction Models. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*. 2017;6(11):787-97.
247. Mohamed AF, Kristoffersson AN, Karvanen M, Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Dynamic interaction of colistin and meropenem on a WT and a resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* as quantified in a PK/PD model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(5):1279-90.
248. Lenhard JR, Bulitta JB, Connell TD, King-Lyons N, Landersdorfer CB, Cheah SE, et al. High-intensity meropenem combinations with polymyxin B: new strategies to overcome carbapenem

resistance in *Acinetobacter baumannii*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2017;72(1):153-65.

249. Ly NS, Bulitta JB, Rao GG, Landersdorfer CB, Holden PN, Forrest A, et al. Colistin and doripenem combinations against *Pseudomonas aeruginosa*: profiling the time course of synergistic killing and prevention of resistance. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2015;70(5):1434-42.

ABSTRACT

The rapid increase in antibiotic resistance during the last decades and the few numbers of recently approved new antibiotics lead to a significant interest to drug combinations. Among these combinations, the β -lactam- β -lactamase inhibitor combination, such as aztreonam-avibactam (ATM-AVI), is one strategy that aims to overcome the resistance due to β -lactamases production, one of the most relevant mechanisms of resistance in Gram-negative bacteria. However, drug interactions can be complex. To better understand the PK/PD of ATM-AVI, two issues have been addressed in this thesis:

- i. ATM-AVI PK at the infection site. A microdialysis study performed in rats with or without peritonitis showed that ATM and AVI distribution in intraperitoneal fluid was rapid and that concentrations at the target site could be predicted from blood concentrations.
- ii. PD interaction between ATM and AVI. Checkerboard experiments analyzed with an Emax model have been used to characterize AVI effect on ATM MIC in terms of efficacy and potency in the presence of various multi-drug resistant strains. A PK/PD model was developed based on *in vitro* data to describe the time-course of ATM-AVI combined effect and to investigate the individual contribution of each of the AVI effects to the combined activity. According to the modeling results, the combined bactericidal activity was mainly explained by AVI enhancing effect, even though AVI demonstrated high efficiency to prevent ATM hydrolysis.

Keywords: aztreonam, avibactam, β -lactam- β -lactamase inhibitor combination, interaction, microdialysis, pharmacokinetic, pharmacodynamics, PK/PD model

RESUME

L'augmentation des résistances aux antibiotiques ces dernières années et le faible nombre de nouveaux antibiotiques récemment approuvés ont suscité un intérêt considérable pour les associations médicamenteuses. Parmi celles-ci, les associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases, comme l'aztréonam-avibactam (ATM-AVI), visent à surmonter la résistance due à la production de β -lactamases, l'un des principaux mécanismes de résistance chez les bactéries à Gram négatif. Cependant, les interactions PD entre molécules associées peuvent être complexes. Afin de mieux comprendre la PK/PD de l'ATM-AVI, deux problématiques ont été abordées dans cette thèse :

- i. La PK de l'ATM-AVI au site infectieux. Une étude de microdialyse réalisée chez le rat avec ou sans péritonite a montré que la distribution de l'ATM-AVI dans le liquide péritonéal était rapide et que les concentrations au site infectieux pourraient être prédites à partir des concentrations sanguines.
- ii. L'interaction PD entre ATM et AVI. Des études de *checkerboard* analysées avec un modèle Emax ont permis de caractériser l'effet de l'AVI sur la CMI de l'ATM en termes d'efficacité et de puissance en présence de souches multi-résistantes. Pour compléter ces résultats, un modèle PK/PD a été développé à partir de données *in vitro* afin d'évaluer l'évolution de l'effet combiné de l'ATM-AVI au cours du temps et d'étudier la contribution individuelle de chacun des effets de l'AVI à l'activité combinée. Selon les résultats de cette modélisation, l'activité bactéricide de l'association serait principalement expliquée par l'effet potentialisateur de l'AVI et ce malgré sa capacité à prévenir la dégradation de l'ATM de manière efficace.

Mots-clés : aztréonam, avibactam, association β -lactamine-inhibiteur de β -lactamases, interaction, microdialyse, pharmacocinétique, pharmacodynamique, modèle PK/PD