LIENS D'INTÉRÊT

Nicolas Meyer a travaillé comme investigateur et/ou consultant et/ou orateur pour : BMS, MSD, Amgen, Roche, GSK, Novartis, Pierre Fabre.

Bruno Ségui travaille comme investigateur pour BMS. Anne Montfort, Céline Colacios, Thierry Levade, Nathalie Andrieu-Abadie déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monothérapie in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol* 2017 ; 28 : 1631-9.
- Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2017 ; 377 : 1345-56.
- Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 2017 ; 168 : 707-23.
- Pages C, Gornet JM, Monsel G, et al. Ipilimumab-induced acute severe colitis treated by infliximab. *Melanoma Res* 2013 ; 23 : 227-30.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975 ; 72 : 3666-70.
- Lienard D, Ewalenko P, Delmotte JJ, et al. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J Clin Oncol* 1992 ; 10 : 52-60.
- Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009 ; 9 : 361-71.
- Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 2012 ; 490 : 412-6.
- Zhao X, Rong L, Li X, et al. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 4094-104.
- Lim SO, Li CW, Xia W, et al. Deubiquitination and stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell* 2016 ; 30 : 925-39.
- Bertrand F, Rochotte J, Colacios C, et al. Blocking tumor necrosis factor alpha enhances CD8 T-cell-dependent immunity in experimental melanoma. *Cancer Res* 2015 ; 75 : 2619-28.
- Bertrand F, Montfort A, Marcheteau E, et al. TNFalpha blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat Commun* 2017 ; 8 : 2256.
- Granier C, Gey A, Dariane C, et al. Biomarqueur et cible thérapeutique en cancérologie. *Med Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 231-7.

NOUVELLE

Une nouvelle classe de macromolécules polycationiques à l'assaut des pathogènes multirésistants

Éric Marsault¹

Université de Sherbrooke, Institut de pharmacologie de Sherbrooke, 3001, 12^e avenue nord, J1J2P6 Sherbrooke, Canada.

eric.marsault@usherbrooke.ca

> La résistance aux antibiotiques est un problème de santé globale important qui requiert de nouvelles classes de molécules antibactériennes [1] (→). Les bactéries multirésistantes du groupe ESKAPE, qui comprend *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter*, sont parmi les plus problématiques [2] (→).

(→) Voir la Synthèse de F. Trémoières, m/s n° 11, novembre 2010, page 925

Les infections associées requièrent de nouvelles classes de molécules aux mécanismes différents des antibiotiques courants [3]. Un nouvel antibiotique devrait idéalement être bactéricide

(→) Voir la Synthèse de F. Barbier et M. Wolff, m/s n° 11, novembre 2010, page 960

contre les pathogènes Gram-positifs et Gram-négatifs, être efficace *in vitro* et *in vivo* et provoquer l'élimination des bactéries tout en possédant une toxicité minimale.

Dans un article publié dans la revue *Nature Communications*, Chin et al. décrivent une nouvelle classe de macromolécules qui répond à ce cahier des charges et offre une perspective prometteuse dans la lutte contre les bactéries multirésistantes [4].

Ces molécules, de la classe des polymères polycationiques, possèdent un squelette polycarbonate assemblé à partir de monomères composés (Figure 1A) de (1) une fonction carbonate pour la polymérisation ; (2) un segment modulable (ou espaceur) pour optimiser les propriétés et comprendre la relation structure-activité ; et (3) une fonction guanidinium

retrouvée dans certains peptides antimicrobiens et des peptides perméants [5]. Dans un premier temps, Chin et al. ont synthétisé 9 monomères possédant des espaceurs alkyle, cycloalkyle ou aryle. L'ouverture des cycles en absence de métaux a permis leur polymérisation. Les polymères ainsi synthétisés ont été purifiés par chromatographie liquide sur gel et leurs chaînes cationiques ont ensuite été déprotégées. Ces polymères possèdent une polydispersité¹ étroite (1,1 – 1,2) qui devrait favoriser la reproductibilité de la synthèse ainsi que l'analyse de la relation structure-activité (RSA). Les auteurs ont évalué l'influence de la masse moléculaire sur l'activité anti-

¹ Elle indique la distribution des masses molaires des différentes macromolécules au sein du polymère. Pour un polymère parfait, où toutes les macromolécules auraient la même masse molaire, la polydispersité est égale à 1.

A

Polymère/ antibiotique	LD ₅₀ /LD ₅ (mg/kg)	^a ED ₅₀ /ED ₉₅ (mg/kg)	^b ED ₅₀ /ED ₉₅ (mg/kg)	^c ED ₅₀ /ED ₉₅ (mg/kg)	^d ED ₅₀ /ED ₉₅ (mg/kg)	^e ED ₅₀ /ED ₉₅ (mg/kg)
		<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	MRSA
pEt_10	43.3/42.4	0.11/0.28	0.24/0.80	0.61/3.32	2.16/7.20	2.57/8.00
pEt_10	44.2/43.1	0.03/0.15	0.14/0.36	0.34/1.76	1.33/7.50	1.57/4.28
Vasomycine/ imipénème	N.D.	0.61/2.69	1.09/2.87	0.35/1.11	13.1/39.7	1.27/2.52

B

Figure 2. Efficacité in vivo des polymères pEt_10 et pEt_20. A. les LD₅₀ et LD₅ (dose unique menant respectivement à 50 % ou 5 % de mortalité), et les ED₅₀ et ED₉₅ (doses efficaces donnant respectivement 50 et 95 % de survie) chez les souris infectées puis traitées par pEt_10 et pEt_20 en comparaison avec les traitements par la vancomycine et l'imipénème pour les modèles d'infections suivants : **a.** modèle murin de péritonite causée par *A. baumannii* 10073 multirésistante, injection par voie intra-péritonéale à 1 h et 6 h post-infection ; **b.** modèle murin de péritonite causée par *A. baumannii* 10073 multirésistante, injection par voie intra-péritonéale à 3 h et 8 h post-infection ; **c.** modèle murin de péritonite causée par *E. coli* 56809 multirésistante, injection par voie intra-péritonéale à 1 h et 6 h post-infection ; **d.** modèle murin de péritonite causée par *K. pneumoniae* 8637 multirésistante, injection par voie intra-péritonéale à 1 h et 6 h post-infection ; **e.** modèle murin de péritonite causée par *S. aureus* 25312 multirésistante, injection par voie intra-péritonéale à 1 h et 6 h post-infection ; **B. Panneau de gauche :** Survie dans un modèle murin de ligature et ponction cœcale (noté CLP, caecal ligation and puncture) ; **panneau de droite :** survie dans un modèle murin d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* PA14. Sham : souris contrôles opérées en absence de CLP ; Gen : souris CLP traitées par la gentamicine ; Imipénème : souris infectées (infection) traitées par l'imipénème (figure reproduite avec la permission de l'éditeur Springer Nature selon les termes de la licence Creative Commons CC BY).

Afin de comprendre leur mécanisme d'action, le coefficient de partition entre l'octanol et l'eau a été déterminé à l'aide d'un analogue fluorescent de pEt_20 et comparé à un polycarbonate portant des groupements ammonium quaternaires. Compte tenu de leur charge, les deux polymères se répartissent partiellement dans la phase aqueuse. L'ajout de laurate de sodium (qui mime un acide gras lié à la membrane) à la phase octanol augmente la partition de pEt_20 dans la phase organique, et le polymère portant des ammoniums quaternaires reste

quant à lui dans la phase aqueuse. Ces expériences suggèrent que pEt_20 pourrait traverser la membrane cellulaire. L'incubation de pEt_20 en présence de *A. baumannii* pendant 2 h à la concentration bactéricide minimale (c'est-à-dire la concentration la plus faible donnant 99,9 % de mort bactérienne [CBM]) ne provoque aucune fuite du contenu cytoplasmique. Ceci suggère que pEt_20 traverse la membrane bactérienne sans modifier son intégrité, contrairement à la polymyxine B qui relâche le contenu cellulaire même à une concentration bactéricide inférieure (0,5 CBM).

L'analyse en microscopie électronique à balayage (MEB) ou à transmission (MET) indique que ni pEt_20 ni pEt_10 ne provoquent de changement morphologique notable de la membrane, après 2 h de traitement à des concentrations élevées (4 fois ou 16 fois la CMI). Les analyses en MET révèlent une précipitation du contenu cytoplasmique des bactéries, qui résulte probablement d'une interaction entre le polymère et des composantes intracellulaires suite au passage membranaire [8]. Le mécanisme d'action est à décrypter, mais sa particularité confère à cette classe de

molécules une puissance et une sélectivité supérieures aux analogues portant des groupements ammonium quaternaires. L'absence de fuite du contenu cytoplasmique bactérien dans le milieu devrait réduire les risques de septicémie résultant du relargage d'endotoxines.

Pour tester le développement possible de résistance, des bactéries *A. baumannii* 10073 ont été traitées par pEt_10 ou pEt_20 pendant 30 passages consécutifs à des concentrations sub-CMI (Figure 1C). La CMI reste stable tout au long des passages, suggérant une absence de développement de résistance dans ces conditions, contrairement à l'imipénème dont l'efficacité diminue à partir du 8^e passage. L'analyse transcriptomique a confirmé que le nombre de gènes altérés en réponse à pEt_20 est bien inférieur à celui reporté en réponse à l'imipénème ; ces gènes ne correspondent pas de surcroît à ceux qui varient lors du développement de résistance.

Pour promouvoir l'application *in vivo* de pEt_10 et pEt_20 contre des infections résistantes, les LD₅₀ et LD₅ (doses uniques menant respectivement à 50 % ou 5 % de mortalité chez la souris) ont été déterminées, révélant des valeurs identiques pour les deux composés et une LD₅ de l'ordre de 42 mg/kg. Le traitement de cellules mononucléées de sang périphérique de souris avec pEt_10 ou pEt_20 a révélé en outre une réponse immunitaire négligeable, estimée par la sécrétion de cytokines.

La biodistribution d'un analogue fluorescent de pEt_20 chez la souris, administré par voie intrapéritonéale (i.p.) ou intraveineuse (i.v.), a révélé une distribution dans le foie, la rate, les poumons et les reins, confirmant sa pénétration tissulaire. Sa demi-vie d'élimination plasmatique de 17 minutes, légèrement supérieure à celles du méropénème, de l'imipénème et du doripénème, combinée à une action bactéricide rapide, permet de proposer le pEt_20 pour des traitements *in vivo*. L'activité antibiotique *in vivo* a été déterminée dans des modèles de péri-

tonite induite par l'injection par voie intrapéritonéale des isolats multirésistants d'*A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ou *SARM* à leur dose létale sur 48 h (Figure 2A). L'injection par voie intrapéritonéale de pEt_10 et pEt_20 à différents temps post-infection (1 h et 6 h ou 3 h et 8 h) a démontré une efficacité élevée dans tous les modèles, avec des ED₅₀ et ED₉₅ (doses efficaces donnant respectivement 50 % et 95 % de survie chez les souris infectées) bien en-deçà de leurs valeurs de LD₅₀, particulièrement pour *A. baumannii*. Ceci confirme une fenêtre thérapeutique élevée, avec un ratio ED₅₀/LD₅₀ supérieur à 1400. Un délai de 2 h dans le traitement augmente peu les valeurs d'ED₅₀ et ED₉₅. Dans les infections par *E. coli* sensibles à l'imipénème, ou les infections par *SARM* sensibles à la vancomycine, les polymères possèdent des valeurs d'ED₅₀ et ED₉₅ similaires à celles des antibiotiques de référence. Cependant, dans des infections par les bactéries *A. baumannii* ou *K. pneumoniae* résistantes à l'imipénème, les polymères sont plus efficaces. En outre, dans les modèles de péritonite induite par *A. baumannii* ou *E. coli*, les polymères induisent une disparition complète des bactéries dans le sang, le liquide péritonéal et les organes, avec des taux d'efficacité supérieurs à 99 % à leur concentration ED₉₅. Ceci est important afin de réduire les risques de septicémie bactérienne.

L'efficacité des deux polymères a été confirmée *in fine* dans un modèle de perforation de l'intestin, consistant en la ligature puis la perforation du cæcum (Figure 2B) [9]. Ce modèle murin reproduit les causes et signes cliniques d'une septicémie par perforation de l'intestin chez l'homme, et implique à la fois des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Le composé pEt_20 présente une efficacité comparable à celle de la gentamicine, estimée par la survie des souris et l'élimination des bactéries. Dans un modèle murin d'infection pulmonaire par *P. aeruginosa* avec l'isolat clinique PA14,

trois injections par voie intraveineuse de pEt_20 à 1 h, 6 h et 25 h post-infection ont sauvé 5 souris infectées sur 6. Par comparaison, seulement 4 souris traitées par l'imipénème ont survécu (Figure 2B). De plus, pEt_20 élimine plus efficacement les bactéries. Par ailleurs, le traitement des souris par pEt_20 à la dose de 8 mg/kg, 2 fois par jour pendant 3 jours (soit 48 mg/kg total) n'a causé ni néphro- ni hépatotoxicité, ni de perturbation du potassium sanguin, suggérant peu d'hémolyse. Une dégradation complète du polymère et une toxicité négligeable de ses produits de dégradation peuvent expliquer ce profil de toxicité avantageux.

En conclusion, les nouveaux polymères pEt_10 et pEt_20 sont des candidats très prometteurs comme nouveaux antibiotiques à large spectre pour le traitement des infections intestinales aux bactéries multirésistantes comme *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *SARM*, *P. aeruginosa*, ainsi que vis-à-vis des infections pulmonaires à *P. aeruginosa*. Leur mécanisme d'action nouveau, l'absence de résistance, leur efficacité *in vivo* et leur excellente fenêtre thérapeutique en font des candidats robustes dans la prévention

(→) Voir la Brève de A. Carcone et al., *m/s* n° 10, octobre 2017, page 869

tantes [10] (→). ♦

A novel class of polycationic macro-molecules against multiresistant pathogens

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Trémolières F. Quand le miracle antibiotique vire au cauchemar. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 925-9.
- Barbier F, Wolff M. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : vers l'imposse thérapeutique ? *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 960-8.
- Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 2008 ; 197 : 1079-81.
- Chin W, Zhong G, Pu Q, et al. A macromolecular approach to eradicate multidrug resistant bacterial infections while mitigating drug resistance onset. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 917.

RÉFÉRENCES

5. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol* 2016 ; 6 : 194.
6. Engler AC, Tan JP, Ong ZY, et al. Antimicrobial polycarbonates: investigating the impact of balancing charge and hydrophobicity using a same-centered polymer approach. *Biomacromolecules* 2013 ; 14 : 4331-9.
7. Wender PA, Galliher WC, Goun EA, et al. Design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 ; 60 : 452-72.
8. Chindera K, Mahato M, Sharma AK et al. The antimicrobial polymer PMHB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 23121.
9. Medina E. Murine model of polymicrobial septic peritonitis using cecal ligation and puncture (CLP). *Meth Mol Biol* 2010 ; 602 : 411-15.
10. Carcone A, Page A, Gilbert C. Le phage KTN4, un candidat prometteur dans la lutte contre les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa* ? *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 869.

NOUVELLE

ESX-4, un système de sécrétion mycobactérien ancestral, essentiel pour la croissance de *Mycobacterium abscessus* dans les phagocytes environnementaux et humains

Fabienne Girard-Misguich¹, Laura Laencina¹, Violaine Dubois¹, Vincent Le Moigne¹, Laurent Kremer^{2,3}, Laleh Maljessi⁴, Roland Brosch⁴, Jean-Louis Herrmann^{1,5}

¹Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, Inserm UMR1173, 78000 Versailles, France.

²Institut de recherche en infectiologie de Montpellier, Université de Montpellier, CNRS UMR 9004, 34293 Montpellier, France.

³Inserm, institut de recherche en infectiologie de Montpellier, 34293 Montpellier, France.

⁴Unité de pathogénomique mycobactérienne, institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

⁵Hôpitaux universitaires Île de France Ouest, Ambroise Paré, Boulogne et Raymond Poincaré, 92380 Garches, France.

fabienne.misguich@uvsq.fr

Mycobacterium abscessus, un pathogène majeur chez les patients atteints de la mucoviscidose

Mycobacterium abscessus est une mycobactérie pathogène opportuniste, à croissance rapide (RGM), responsable d'infections cutanéomuqueuses et pulmonaires. Ces dernières sont particulièrement sévères chez les patients atteints de mucoviscidose [1]. Les études épidémiologiques ont révélé la persistance de *M. abscessus* chez l'hôte infecté, parfois pendant plusieurs années [2]. Plus que d'autres infections par des bactéries pathogènes retrouvées chez les personnes atteintes de mucoviscidose, les infections pulmonaires à *M. abscessus* altèrent la fonction ventilatoire, entraînant une augmentation de la morbidité et de la mortalité chez ces patients. L'origine de l'infection par *M. abscessus* reste à déterminer. Une étude britannique récente, fondée sur la recherche de mutations spécifiques dans les souches de *M. abscessus* circulant en Grande-Bretagne, suggère soit une contamination

entre patients, soit une contamination par l'environnement proche du patient [3]. Le réservoir environnemental de *M. abscessus* reste encore mal défini [4]. Les études génomiques, par séquençage du génome total, montrent la présence de gènes non-mycobactériens acquis par transfert horizontal au sein du génome de *M. abscessus*, ainsi que la présence de gènes de résistance pour la survie intracellulaire de la bactérie. D'autres études suggèrent que ces échanges génétiques horizontaux se réaliseraient dans un écosystème commun, notamment à l'interface sol/eau où les amibes environnementales sont présentes. Ces amibes représentent un hôte eucaryote unicellulaire naturel et un réservoir pour de nombreuses bactéries pathogènes, telles que *Legionella*, *Chlamydia* et *Pseudomonas*, et probablement aussi pour certaines espèces mycobactériennes, comme *M. abscessus*, qui peuvent ainsi survivre dans l'environnement. Des résultats publiés par notre équipe montrent que *M. abscessus* est capable

de se multiplier au sein d'amibes. Une co-culture d'amibes et de *M. abscessus* avant infection chez l'animal, augmente la virulence de la mycobactérie [5], comme cela avait déjà été démontré pour une autre mycobactérie, *Mycobacterium avium* [6]. Au cours du processus infectieux, les amibes peuvent ainsi contribuer à forger la virulence des mycobactéries pour s'adapter face à la réponse immunitaire.

Chez l'homme, une différence clé entre les mycobactéries non pathogènes et pathogènes, comme le bacille de la tuberculose *Mycobacterium tuberculosis*, est la capacité des mycobactéries pathogènes à survivre et à se répliquer dans les macrophages et les cellules dendritiques en bloquant la maturation des phagosomes [7].

Nous avons démontré récemment que *M. abscessus* possède également ces propriétés de survie intracellulaire [8] (→). La coexistence de *M. abscessus* avec les

(→) Voir la Nouvelle de A. Bernut et al. m/s n° 5, mai 2014, page 499